

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



①9 **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 199 07 099 A 1**

⑤① Int. Cl.⁷:
C 07 H 21/00
C 12 N 15/16
C 12 N 15/55
A 61 K 48/00

⑳ Aktenzeichen: 199 07 099.7
㉔ Anmeldetag: 19. 2. 1999
㉓ Offenlegungstag: 7. 9. 2000

DE 199 07 099 A 1

⑦① Anmelder:
Theragene Biomedical Laboratories GmbH, 82152
Planegg, DE

⑦④ Vertreter:
Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col.,
50667 Köln

⑦② Erfinder:
Hauser Funke, Charlotte, Dr., 80639 München, DE

⑤⑥ **Entgegenhaltungen:**

US 57 56 264
US 56 88 677
US 55 97 693
US 55 80 722
WO 94 28 150 A1
WO 9 74 119 A1

Biochemistry 32(1993)11627-11637;
Biochemistry 30(1991)1628-1635;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ **Hormon-Hormonrezeptorkomplexe und Nukleinsäurekonstrukte und ihre Verwendung in der Gentherapie**

⑤⑦ Die Erfindung stellt eine Stoffzusammensetzung bereit, die eine Nukleotidsequenz umfaßt, die wenigstens ein hormonresponsives Element (HRE) umfaßt, wobei dieses hormonresponsive Element an einem Hormon-Hormonrezeptorkomplex gekoppelt ist;
des weiteren stellt sie Nukleinsäurekonstrukte bereit, die wenigstens ein hormonresponsives Element (HRE) umfassen, wobei das hormonresponsive Element ein Gen reguliert, das für einen menschlichen Gerinnungsfaktor kodiert und die Erfindung in der Gentherapie und besonders bei der Behandlung menschlicher Blutgerinnungsstörungen, wie z. B. Hämophilie, Anwendung findet.

DE 199 07 099 A 1

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

1. Gegenstand der Erfindung

Die Erfindung stellt eine Stoffzusammensetzung bereit, die eine Nukleotidsequenz enthält, welche mindestens ein hormonresponsives Element (HRE) umfaßt, wobei dieses hormonresponsive Element an einen Hormon-Hormonrezeptor-komplex gekoppelt ist. Sie betrifft ferner Nukleinsäurekonstrukte, die mindestens ein hormonresponsives Element umfassen, sowie Vektoren, die solche Konstrukte enthalten, worin das hormonresponsive Element ein Gen reguliert, welches für einen menschlichen Blutgerinnungsfaktor kodiert. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte, Plasmide und Stoffzusammensetzungen kommen in der Gentherapie zur Anwendung, insbesondere in der Behandlung menschlicher Blutgerinnungsstörungen, beispielsweise Hämophilie. Sie können auch dazu verwendet werden, Zielgene herauf oder herunter zu regulieren, sowie um Impfstoffe zu verabreichen.

2. Zusammenfassung des Standes der Technik

Die Gentherapie stellt für zahlreiche Krankheiten und Defekte eine äußerst vielversprechende Methode dar. Allgemein gesprochen beinhaltet sie den Transfer rekombinanter Gene oder Transgene in somatische Zellen, um mit einem genetischen Defekt behaftete Proteine zu ersetzen oder den pathologischen Prozeß einer Krankheit zu beeinflussen. Ihrem Prinzip nach ist die Gentherapie eine einfache Methode. In der Praxis müssen noch viele Nachteile überwunden werden.

Die Forschung im Bereich der Gentherapie hat sich auf Wege konzentriert, DNA möglichst effektiv in Zellen eines Patienten zu inkorporieren. Gegenwärtig sind virale Vektoren die Träger, welche in klinischen Gentherapieansätzen gemeinhin verwendet werden. In puncto Genexpressionseffizienz haben die viralen Verabreichungssysteme große Vorteile im Vergleich zu Techniken, die DNA-Lipid-Formulierungen als Träger zur Verabreichung verwenden, oder im Vergleich zu mechanischen Methoden, beispielsweise der "gene gun". Obwohl es eine Vielfalt viraler Systeme gibt, die für gentherapeutische Strategien getestet wurden, sind retrovirale Vektoren und adenovirale Vektoren gegenwärtig die am meisten verwendeten Träger (Salmons, B. and Gunzburg, W.H., Hum. Gene Ther., Vol. 4, 129, 1993; Kasahara, N.A., et al., Science, Vol. 266, 1373, 1994; Ali, M., et al. Gene Ther., Vol. 1, 367, 1994). Dennoch haben diese Systeme große Nachteile, etwa die Möglichkeit viraler Kontamination. Andere Sicherheitsbedenken stehen nach wie vor der Entwicklung einer klinischen Anwendung der Gentherapie unter Verwendung dieser viralen Systeme im Wege. So weisen beispielsweise rekombinante Retroviren den Nachteil der zufälligen chromosomalen Integration auf, welche zur Aktivierung von Onkogenen oder zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen kann. Des weiteren hat die wiederholte Anwendung rekombinanter Adenoviren schwerwiegende immunologische Probleme verursacht (Elkon, K.B. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 94, 9814, 1997). Die humorale Antwort führte zur Produktion von Antikörpern gegen Adenovirusproteine, welche eine nachfolgende Infektion verhinderten. Immunsuppressive Medikamente können diese Wirkungen abschwächen, aber sie stellen für den Patienten eine zusätzliche Belastung dar (Dai, Y., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 92, 1401, 1995).

Ein anderes virales Verabreichungssystem beruht auf dem adenoassoziierten Virus (AAV). Das AAV erfordert eine Koinfektion mit einem nicht verwandten Helfervirus. Obwohl solche rekombinanten AAV-Virionen sich für die Einführung zahlreicher kleiner Gensequenzen in Wirtszellen als nützlich erwiesen haben, so sind Genverabreichungssysteme, welche auf solchen Partikeln basieren, durch die verhältnismäßig kleine Größe der AAV-Partikel limitiert. Diese Eigenschaft vermindert die Bandbreite geeigneter genetischer Protokolle in hohem Maße. Darüber hinaus stellt die Notwendigkeit, ein Helfervirus einzusetzen, einen weiteren komplizierenden Faktor dieses Verabreichungssystems dar. (Muzyczka, N., Curr. Top. Microbiol. Immunol., Vol. 158, 97, 1992).

Nicht-virale Gentherapieansätze sind ebenfalls nicht zufriedenstellend, obwohl sie sicherer sind. Probleme im Zusammenhang mit ineffizienter Genverabreichung oder schwacher kontinuierlicher Expression stellen wesentliche Nachteile dar. Methoden wie beispielsweise die direkte Injektion von DNA in zelluläre Kompartimente bis hin zu Gemischen aus DNA und kationischen Lipiden oder Polylysin, welche einen leichteren Durchtritt des Transgens durch die Zellmembran erlauben, haben diese Hürden noch nicht überwunden. (Felgner, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 84, 7413, 1987; Behr, J.-P., Bioconjugate Chemistry, Vol. 5, 382, 1994).

Mit der Einführung nackter DNA (Polynukleotid-)Sequenzen (einschließlich Antisense-DNA) in Vertebraten ist eine kontrollierte Expression eines Proteins möglich. Es wird berichtet, daß eine Verabreichung der Polynukleotidsequenzen in Geweben wie beispielsweise Muskeln, Gehirn oder die Haut durch Injektion oder durch die Einführung in den Blutkreislauf erreicht werden kann. (Wolff, J.A., et al., Science, Vol. 247, 1990; Lin H., et al., Circulation, Vol. 82, 2217, 1990; Schwartz, B., et al., Gene Ther., Vol. 3, 405, 1996). Desweiteren wurde ein direkter Gentransfer in Säugetiere im Zusammenhang mit in Liposomen verkapselter DNA und mit DNA, die in Proteosomen eingeschlossen war, welche Rezeptorproteine enthielten, berichtet. Obwohl die Injektion nackter DNA zur Expression des Transgens führt, ist die Effizienz bei weitem nicht mit der von DNA-Verabreichungssystemen auf der Basis von Viren vergleichbar. Dennoch hat nackte DNA den Vorteil, daß mögliche pathogene Effekte ausbleiben. Eine Einschränkung der Methode der Injektion nackter DNA bedeutet die Tatsache, daß die Transgenexpression dosisabhängig ist. Die Genexpression kann einen Sättigungspunkt erreichen, und eine Zunahme der injizierten DNA-Menge führt zu einer verminderten Proteinproduktion pro Plasmid. Demzufolge kann die Proteinexpression dramatisch sinken, wenn die Menge an injizierter DNA oberhalb eines gewissen Schwellenwertes liegt.

Unter den genetischen Erkrankungen, welche der Fachmann sich mit Hilfe dieser Methoden des Stands der Technik zu überwinden bemüht hat, sind diejenigen, die im Zusammenhang mit Blutgerinnungsdefekten stehen, und insbesondere Hämophilie (Lozier, J.N. and Brinkhous, K.M., JAMA, Vol. 271, 1994; Hoeben, R.C., Biologicals, Vol. 23, 27, 1995). Hämophilie A und B beispielsweise sind X-gekoppelte, rezessive Blutungsstörungen, welche durch Defekte der Blutge-

rinnungsfaktoren VIII bzw. IX verursacht werden (Sadler, J.E. et al., in: The Molecular Basis of Blood Diseases, 575, 1987). Hämophilie tritt mit einer Häufigkeit von etwa eins zu 5000 bei männlichen Neugeborenen auf. Hämophiliepatienten leiden an exzessiven Blutungen infolge fehlender Blutgerinnung an Verwundungsstellen. Die Unfähigkeit zur richtigen Blutgerinnung bedingt auch Gelenkschäden sowie Schäden der inneren Gewebe und verursacht darüber hinaus Risiken im Zusammenhang mit der richtigen Behandlung von Schnitten.

Hämophilie A läßt sich durch Verabreichung des Blutgerinnungsfaktors VIII behandeln. Bis vor kurzem mußten Faktor VIII-Präparate durch die Konzentrierung von Spenderblut gewonnen werden, wodurch das Risiko einer Kontamination mit infektiösen Agentien, etwa HIV oder Hepatitis, gegeben war. Das Faktor VIII-Gen ist kloniert worden (z. B. Vehar et al., Nature, Vol. 312, 337, 1984), wodurch die Herstellung eines rekombinanten Produktes ermöglicht wurde. Obwohl Faktor VIII mittels rekombinanter Methoden in einer höheren Reinheit als aus den Blutkonzentraten bereitgestellt werden kann, erfordert die exogene Versorgung eines Patienten mit Faktor VIII noch immer die Verabreichung wiederholter Dosen während des gesamten Lebens des Patienten, eine unpraktische und teure Lösung. Andere Hämophilieformen schließen Hämophilie B ein, welche durch einen Defekt des für Faktor IX kodierenden Gens verursacht wird. Die oben beschriebenen Gentherapiesysteme wurden im Zusammenhang mit der Behandlung von Hämophilie A und B mit Faktor VIII bzw. IX bemüht (siehe z. B. WO 94/29471). Diese Systeme weisen jedoch die oben bereits diskutierten Nachteile auf.

Das klassische Modell der Hormonwirkung basiert auf dem Konzept der Bindungswechselwirkung des Hormons mit einem intrazellulären Rezeptor, welcher im Zytoplasma oder im Kern lokalisiert ist (Evans, R. Science, Vol. 240, 889, 1988). Diese intrazellulären Rezeptoren verbleiben im latenten Zustand bis sie ihrem jeweiligen Zielhormon ausgesetzt werden. Bei einer solchen Exposition verändert der Hormonrezeptor nach der Bindung des Hormons seine Konformation und transloziert in der aktivierten Form in den Zellkern, wo er als Dimer an hormonresponsive Elemente (HRE) in der Promotorregion hormonregulierter Gene bindet (Beato, M., Cell, Vol. 56, 335, 1989; O'Malley, B., et al., Biol. Reprod., Vol. 46, 163, 1992). Die HRE sind "enhancer"-Elemente, die sich gewöhnlich in der 5'-flankierenden Region des jeweiligen hormoninduzierten Gens befinden.

Der Steroidrezeptor stellt ein Beispiel für solche intrazellulären Rezeptoren dar. Steroidrezeptoren gehören zu einer Superfamilie ligandenabhängiger Transkriptionsfaktoren, für die eine einzigartige molekulare Struktur charakteristisch ist. Die zentral angeordnete, hoch konservierte, DNA-bindende Domäne definiert diese Superfamilie. Die zweite wichtige und vergleichsweise invariante Region ist die COOH-terminale Ligandenbindungsdomäne. Ein Beispiel für einen solchen Rezeptor ist der Progesteronrezeptor, der durch das Steroid Progesteron gesteuert wird. Bei dem Progesteronrezeptor wirkt Progesteron als natürlicher Agonist, und als solcher zeigt es starke anti-mineralokortikoide Eigenschaften sowohl auf der molekularen als auch auf der systemischen Ebene. Neben den klassischen Uteruseffekten wurden dem Progesteron in zahlreichen Studien auch anti-epileptische, anxiolytische, hypnotische und anästhetische Eigenschaften zugeordnet.

Methoden für die Verwendung von Rezeptormutanten, einschließlich Steroidrezeptormutanten für die Gentherapie, sind vorgeschlagen worden. Solche Methoden sind beispielsweise in WO 93/23431, WO 98/18925 und WO 96/40911 offenbart. WO 98/33903 offenbart ein genetisches Konstrukt, welches ein steroidresponsives Element eines gewebespezifischen Gens, eine kodierende Sequenz und einen SV40 "enhancer" umfaßt.

Kurze Beschreibung der Erfindung

Das Ziel der vorliegenden Erfindung besteht darin, die Nachteile der früheren Gentherapieverabreichungssysteme zu überwinden. Das Verabreichungssystem gemäß der vorliegenden Erfindung ist eine Stoffzusammensetzung, die eine Nukleinsäure enthält, welche mindestens ein hormonresponsives Element (HRE) umfaßt, wobei dieses hormonresponsive Element an einen Hormon-Hormonrezeptorkomplex gekoppelt ist. Eine bevorzugte Ausführungsform der Stoffzusammensetzung gemäß der vorliegenden Erfindung ist eine, in der das hormonresponsive Element ein steroidresponsives Element (SRE) und der Rezeptor ein Steroidrezeptor ist. In der am meisten bevorzugten Ausführungsform ist das hormonresponsive Element ein progesteronresponsives Element (PRE) und der Rezeptor ist ein Progesteronrezeptor.

Die vorliegende Erfindung stellt ein Verabreichungssystem für die Gentherapie bereit, welches die Nachteile des Standes der Technik überwinden sollte. Das Vorhandensein des hormonresponsiven Elements in Verbindung mit der Nukleinsäure, die für ein interessierendes Gen kodiert, fördert und verstärkt die Genexpression und, was noch wichtiger ist, fördert das Binden eines Hormon-Hormonrezeptorkomplexes. Ein hormonresponsives Element ist bevorzugt in Form einer dimeren oder multimeren Nukleinsäuresequenz vorhanden. Sogar eine inverse Orientierung des hormonresponsiven Elements wird zu dessen richtiger Funktion führen. Der Hormon-Hormonrezeptorkomplex enthält einen Hormonrezeptor, der nach Bindung seines spezifischen Hormons aktiviert wird. In aktivierter Form ist der Hormonrezeptor in der Lage, sein spezifisches hormonresponsives Element, das gemäß der vorliegenden Erfindung mit einer Nukleinsäure kombiniert ist, die das erwünschte Gen, beispielsweise einen menschlichen Blutgerinnungsfaktor enthält, zu erkennen und daran zu binden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Nukleinsäurekonstrukt, das mindestens ein hormonresponsives Element (HRE) enthält und insbesondere mindestens ein hormonresponsives Element für die Regulation eines Gens, das für einen menschlichen Blutgerinnungsfaktor kodiert. Eine bevorzugte Ausführungsform ist eine, in der das hormonresponsive Element ein steroidresponsives Element (SRE) ist. In einer besonders bevorzugten Form ist das hormonresponsive Element ein progesteronresponsives Element (PRE).

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung sind Vektoren, die die Nukleinsäurekonstrukte gemäß der vorliegenden Erfindung enthalten. Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung schließen desweiteren transfizierten und transformierten Zellen ein, welche diese Vektoren und/oder Nukleinsäuren enthalten.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind pharmazeutische Zusammensetzungen, die eine therapeutisch wirksame Dosis der erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte sowie ein Hormon enthalten. Das Hormon ist vorzugsweise ein Steroid, besonders bevorzugt Progesteron. Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist die Verwendung

der Stoffzusammensetzungen und Nukleinsäurekonstrukte als Medikamente gegen genetische Defekte und Erkrankungen, beispielsweise Hämophilie, sowie die Verwendung der Stoffzusammensetzungen und Nukleinsäurekonstrukte für die Herstellung eines Medikamentes gegen genetische Defekte und Erkrankungen, beispielsweise Hämophilie.

Die Erfindung beinhaltet ferner ein Verfahren zur Einführung eines Nukleinsäurekonstruktes, das für ein interessierendes Gen, beispielsweise einen menschlichen Blutgerinnungsfaktor, kodiert, in eine Zelle, um das interessierende Gen in der Zelle zu exprimieren. Dieses Verfahren bringt eine Nukleinsäure in die Zelle ein (beispielsweise mittels eines Vektors), so daß die Zelle das Gen, für das die fremde Nukleinsäure kodiert, exprimiert. Bei diesem Verfahren wird die Nukleinsäure, welche für das Gen, beispielsweise einen menschlichen Blutgerinnungsfaktor, kodiert, mit einem Nukleinsäurekonstrukt kombiniert, welches mindestens ein hormonresponsives Element (HRE), bevorzugt ein progesteronresponsives Element, enthält. Das Vorhandensein des hormonresponsiven Elements in Verbindung mit der Nukleinsäure, welche für das Gen, beispielsweise einen menschlichen Blutgerinnungsfaktor, kodiert, fördert und verstärkt die Genexpression und fördert die Bindung eines Hormon-Hormonrezeptorkomplexes in der Zielzelle.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zur Behandlung eines Blutgerinnungsdefektes durch Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge der erfindungsgemäßen Stoffzusammensetzung an einen Organismus.

Eine weitere Ausführungsform gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren stellt die Impfung dar. Die Einführung eines Nukleinsäurekonstruktes oder einer Stoffzusammensetzung der Erfindung, die ein Gen für ein Antigen oder virale Sequenzen enthält, in eine Zelle (DNA oder mRNA-Impfstoffe) unter Verwendung des oben erwähnten Verfahrens kann auch einen Weg darstellen, um die zelluläre Immunantwort zu stimulieren.

Kurze Beschreibung der Abbildungen

Abb. 1 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG1.

Abb. 2 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG4.

Abb. 3 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG5.

Abb. 4 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG6.

Abb. 5 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG7.

Abb. 6 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG8.

Abb. 7 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG9.

Abb. 8 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG11.

Abb. 9 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG11.

Abb. 10 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG13.

Abb. 11 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG14.

Abb. 12 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG15.

Abb. 13 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG16.

Abb. 14 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG18.

Abb. 15 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG19.

Abb. 16 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG20.

Abb. 17 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG21.

Abb. 18 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG22.

Abb. 19 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG23.

Abb. 20 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG24.

Abb. 21 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG25.

Abb. 22 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG26.

Abb. 23 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG27.

Abb. 24 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG28.

Abb. 25 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG29.

Abb. 26 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG30.

Abb. 27 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG31.

Abb. 28 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG32.

Abb. 29 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG33.

Abb. 30 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG2.

Abb. 31 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG34.

Abb. 32 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG35.

Abb. 33 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG36.

Abb. 34 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG37.

Abb. 35 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG38.

Abb. 36 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG53.

Abb. 37 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG64.

Abb. 38 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG0.

Abb. 39 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG66.

Abb. 40 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG67.

Abb. 41 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG68.

Abb. 42 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG69.

Abb. 43 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG82.

Abb. 44 ist ein Diagramm des Vektors pTGFG95.

Abb. 45 ist die DNA-Sequenz des Vektors pTGFG36 (SEQ ID No. 1).

Abb. 46 ist die DNA-Sequenz des Vektors pTGFG67 (SEQ ID No. 2).

Abb. 47 zeigt eine GFP-Konzentrationskurve für Zellhomogenisate nach der Transfektion mit pTGFG5 bzw.

pTGF α G20.

Abb. 48 zeigt korrespondierende licht- (a und c) und fluoreszenzmikroskopische (b und d) Aufnahmen von HeLa-Zellen nach der Transfektion mit pTGF α G5 (a und b) bzw. pTGF α G20 (c und d).

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

5

1. Definitionen

"Nukleinsäure" bedeutet DNA, cDNA, mRNA, tRNA. Die Nukleinsäure kann linear oder zirkulär, doppel- oder einzelsträngig sein.

10

"Nukleinsäurekonstrukt" bezieht sich auf einen Verbund sich aufeinander beziehender Nukleinsäureelemente. Die Nukleinsäureelemente des Konstruktes können in einer solchen Orientierung in einem Vektor inkorporiert sein, daß das interessierende Gen transkribiert werden kann und, wenn erwünscht, ein erwünschtes Protein exprimiert werden kann.

"Hormonresponsives Element" (HRE) bezieht sich auf Nukleinsäure- und insbesondere DNA-Bereiche, die als Folge der Hormonaktivierung die Transkription von Genen regulieren. Typischerweise haben HREs eine Länge von etwa 10-40 Nukleotiden, und insbesondere von etwa 13-20 Nukleotiden. Wie oben erklärt, werden HREs aktiviert, wenn ein Hormon an seinen korrespondierenden intrazellulären Rezeptor bindet und eine Konformationsänderung verursacht, so daß der Rezeptor eine erhöhte Affinität für das HRE aufweist und daran bindet. Das HRE wiederum stimuliert die Transkription. Ein "steroidresponsives Element" (SRE) ist ein HRE, das als Antwort auf die Steroidaktivierung die Transkription von Genen reguliert. Ein "progesteronresponsives Element" (PRE) ist ein HRE/SRE, das die Transkription von Genen als Folge der Progesteronaktivierung reguliert.

15

20

"Hormonrezeptor" bezieht sich auf einen Rezeptor, der an ein Hormon bindet oder durch ein Hormon aktiviert wird. "Steroidrezeptor" bezeichnet einen Rezeptor, der an ein Steroidhormon bindet oder durch dieses aktiviert wird. Ein "Progesteronrezeptor" ist ein Rezeptor, der an das Steroidhormon Progesteron bindet oder durch dieses aktiviert wird.

"Gen" bezeichnet DNA, die an der Expression eines Polypeptids beteiligt ist, welches wahlweise "leader" und "trailer" Sequenzen, sowie Introns und Exons enthalten kann.

25

"Vektor" bezeichnet jedwedes genetische Konstrukt, etwa ein Plasmid, einen Phagen, ein Kosmid etc., das replizieren kann, wenn es mit den richtigen Kontrollelementen assoziiert ist und das Gensequenzen zwischen Zellen transferieren kann. Dieser Begriff umfaßt Klonierungs- und Expressionsvehikel.

"Promotor" bezeichnet eine Region regulatorischer DNA-Sequenzen für die Kontrolle der Gentranskription, an welche die RNA-Polymerase bindet. Der Promotor bildet mit RNA-Polymerase einen Initiationskomplex, um die Transkription zu initiieren und anzutreiben. "Enhancer" können den Komplex aktivieren, oder "silencer" können ihn inhibieren. Ein "gewebespezifischer Promotor" ist ein Promotor, welcher in der DNA eines Gewebes für die Transkription von Genen, die in spezifischen Geweben exprimiert werden, gefunden wird.

30

"Therapeutisch wirksame Dosis" der erfindungsgemäßen Produkte bezeichnet eine Dosis, die zum Zwecke der Behandlung oder der Prophylaxe wirksam ist, beispielsweise eine Dosis, welche eine wirksame Behandlung oder Verminderung der Symptome der Hämophilie herbeiführt. Sie ist ferner eine Dosis, welche die Expression eines Zielgenes meßbar aktiviert, was durch Messungen der Spiegel des Zielproteins bestimmt werden kann, oder eine Dosis, von der man durch Extrapolation von in-vitro- oder in-vivo-Daten vorhersagen kann, daß sie zum Zwecke der Behandlung oder der Prophylaxe wirksam sein wird. Die Bestimmung einer therapeutisch wirksamen Dosis liegt innerhalb des Erfahrungsreichs des Fachmanns.

35

40

"Kodiert" oder "kodierend" bezieht sich auf eine Nukleinsäuresequenz, welche (im Falle von DNA) transkribiert oder (im Falle von mRNA) in vitro oder in vivo in ein Polypeptid translatiert wird, wenn sie unter die Kontrolle geeigneter regulatorischer Sequenzen gesetzt wird.

Im Sinne dieser Anmeldung bezieht sich "exprimieren", "exprimierend" oder "Expression" auf die Transkription und Translation eines Genes, das für ein Protein kodiert.

45

2. Detaillierte Beschreibung und Beispiele

Wie oben gesagt, besteht eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung darin, ein neues und verbessertes Verabreichungssystem für die Gentherapie bereitzustellen. So stellt die Erfindung in einer Ausführungsform eine Stoffzusammensetzung bereit, die eine Nukleinsäure enthält, welche mindestens ein hormonresponsives Element (HRE) umfaßt, wobei dieses hormonresponsive Element an einen Hormon-Hormonrezeptorkomplex gekoppelt ist. Eine bevorzugte Ausführungsform der Stoffzusammensetzung der Erfindung ist eine, in der das HRE ein steroidresponsives Element (SRE) und der Rezeptor ein Steroidrezeptor ist. Besonders bevorzugt ist ein progesteronresponsives Element (PRE) als hormonresponsives Element und ein Progesteronrezeptor als Rezeptor.

50

55

HREs, die sich potentiell in der vorliegenden Erfindung verwenden lassen, sind bereits beschrieben worden, beispielsweise GREs (Scheidereit, C., et al., Nature, Vol. 304, 749, 1983; von der Ahe, D., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 83, 2817, 1986), EREs oder PREs (Chambon, P., et al., Rec. Prog. Horm. Res., Vol. 40, 1, 1984; Klock, G., et al., Nature, Vol. 329, 734, 1987). Es wurde oben bereits festgestellt, daß erfindungsgemäß das am meisten bevorzugte HRE ein PRE ist. Insbesondere ist das PRE bevorzugt, welches in Beispiel 1 beschrieben ist. Die Nukleinsäure, welche erfindungsgemäß verwendet wird, enthält mindestens ein hormonresponsives Element. Bevorzugt ist eine Nukleinsäure, welche ein HRE enthält, sie kann aber auch mehr als ein HRE enthalten. So kann die Nukleinsäure beispielsweise 3 oder 5 HREs enthalten. Die am meisten bevorzugte Ausführungsform ist eine Nukleinsäure, welche ein PRE enthält.

60

Hormonrezeptoren, die sich potentiell in der vorliegenden Erfindung verwenden lassen, sind beispielsweise Östrogenrezeptoren, Mineralkortikoidrezeptoren, Glukokortikoidrezeptoren, Retinsäurerezeptoren, Androgen-, Calcitriol-, Schilddrüsenhormon- oder Progesteronrezeptoren, sowie "orphan"-Rezeptoren. Solche Rezeptoren sind in der Vergangenheit beschrieben worden (Green, S., et al., Nature, Vol. 320, 134, 1986; Green, G.L., et al., Science, Vol. 231, 1150,

65

1986; Arriza, J.L., et al., Science, Vol. 237, 268, 1987; Hollenberg, S.M., et al., Nature, Vol. 318, 635, 1985; Petkovitch, M., et al., Nature, Vol. 330, 444, 1987; Giguere, V., et al., Nature, Vol. 330, 624, 1987; Tilley, W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 86, 327, 1989; Baker, A.R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 85, 3294, 1988; Weinberger, C., et al., Nature, Vol. 324, 641, 1986; Sap, J., et al., Nature, Vol. 324, 635, 1986; Misrahi, M., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 143, 740, 1987; Kastner, P., et al., Cell, Vol. 83, 859, 1995). Diese Rezeptoren können von Menschen oder von anderen Säugetieren stammen, obwohl menschliche bevorzugt sind. Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen menschlicher Steroidrezeptoren sind in der GenBank erhältlich: Mineralcortikoidrezeptor: M16801; Glukokortikoidrezeptor α : M10901; Glukokortikoidrezeptor α_2 : U01351; Glukokortikoidrezeptor β : M11050; Retinsäurerezeptor α : AF088888 (Exon 1), AF088889 (Exon 2), AF088890 (Exon 3), AF088891 (Exon 4), AF088892 (Exon 5 und 6), AF088893 (Exon 7), AF088894 (Exon 8), AF088895 (Exon 9 und die komplette cDNA); Retinsäurerezeptor γ : M24857; Androgenrezeptor: M27423 (Exon 1), M27424 (Exon 2), M27425 (Exon 3), M27436 (Exon 4), M27427 (Exon 5), M27428 (Exon 6), M27429 (Exon 7), M27430 (Exon 8); Schilddrüsenhormonrezeptor α_1 : M24748, Schilddrüsenhormonrezeptor α_2 : J03239; Progesteronrezeptor: AF016381; Somatotropinrezeptor: J00148; Vitamin D-Rezeptor (Calcitriolrezeptor): J03258.

Der Fachmann wird verstehen, daß die Rezeptorproteine mittels Standardmethoden exprimiert werden können, beispielsweise durch PCR-Klonierung der bekannten cDNAs aus cDNA-Banken und Überexpression der korrespondierenden Proteine in geeigneten Expressionsvektoren, wie beispielsweise in den Vektoren der vorliegenden Erfindung, in geeigneten Wirtszellen, beispielsweise COS-Zellen. In entsprechender Weise kann eine nachfolgende Aufreinigung der zytosolischen Fraktion mittels Routinemethoden wie beispielsweise durch Affinitätschromatographie-Aufreinigung erzielt werden. Zu diesem Zweck sind diverse geeignete Antikörper gegen den erwünschten Rezeptor kommerziell erhältlich. So lassen sich beispielsweise polyklonale Antikörper gegen den Mausprogesteronrezeptor, welche eine ausreichend hohe Kreuzreaktivität für das menschliche Protein aufweisen, von Dianova (Hamburg, Deutschland) beziehen. Weitergehende Aufreinigung kann ebenfalls mit Standardmethoden erzielt werden, beispielsweise mittels chromatographischer Methoden wie etwa Ionenaustauschchromatographie und/oder FPLC.

Der am meisten bevorzugte Rezeptor ist der Progesteronrezeptor. Bevorzugterweise ist der Rezeptor ein humaner Progesteronrezeptor. Solch ein humaner Progesteronrezeptor (aus menschlichen T47D Brustkrebszellen) ist in dem US Patent Nr. 4.742.000 offenbart, und Zellen, welche diesen Rezeptor exprimieren, sind hinterlegt (ATCC Hinterlegungsnummer HTB, 133). Wie oben bereits beschrieben, wäre eine Aufreinigung eines solchen Rezeptors aus dem Zytosol mit Hilfe rezeptorspezifischer Antikörper eine Routineangelegenheit. Desweiteren offenbart das US Patent Nr. 4.742.000 ein Verfahren zur Aufreinigung des humanen Progesteronrezeptors mittels eines spezifischen Steroidaffinitätscharzes (vgl. Grandics et al., Endocrinology, Vol. 110, 1088, 1982). Kurz gesagt wird die zytosolische Fraktion der T47D-Zellen dabei über Sterogel gegeben, ein kommerzielles Präparat aus Desoxycorticosteron, das an Sepharose 2B gekoppelt ist und den Progesteronrezeptor selektiv bindet. Nach Waschschritten mit Auftragspuffer wird der gebundene Rezeptor mit einem Progesteron enthaltenden Puffer eluiert. Der eluierte Steroidrezeptorkomplex wird dann auf DEAE-Biogel chromatographiert und schrittweise mit einem 0,2 molaren NaCl-Puffer eluiert. Danach läßt sich das gebundene Progesteron leicht austauschen. Wie oben beschrieben, läßt sich eine weitere Aufreinigung mittels Routinemethoden, die dem Fachmann wohl bekannt sind, erzielen.

Mutierte Versionen dieser Rezeptoren und deren Derivate, die sich die Funktion der Rezeptoren aufweisen, einen Liganden zu binden und dadurch aktiviert zu werden, und welche DNA binden und die Transkription regulieren, können ebenfalls in der Erfindung eingesetzt werden. Solch ein Derivat kann ein chemisches Derivat sein, eine Variante, sowie eine Chimäre, Hybrid, Analog oder ein Fusionsprodukt.

Das Hormon in der Stoffzusammensetzung kann synthetische oder natürliche Hormone umfassen, etwa Östrogen, Testosteron, Glukokortikoid, Androgen, Schilddrüsenhormon, Progesteron oder Derivate hiervon. Diese sind allgemein erhältlich. Progesteron ist am meisten bevorzugt. So wird natürliches mikronisiertes Progesteron beispielsweise seit 1980 in Frankreich unter dem Markennamen UTROGESTAN® vertrieben. Seine Eigenschaften sind denen des endogenen Progesterons ähnlich, insbesondere weist es antiöstrogene, gestagene, schwach antiandrogene und antimineralcortikoid Eigenschaften auf.

Mikronisiertes Progesteron besitzt Vorteile, welche es zu einem geeigneten Träger machen, um Gene oder Nukleinsäurekonstrukte in ihre Zielzellen zu bringen. Insbesondere führt der synergistische Effekt des doppelten Prozesses einer Mikronisierung und Suspension in langkettigen Fettsäuren zu einer erhöhten Progesteronabsorption. Es ist gezeigt worden, daß nach oraler Verabreichung von 100 mg UTROGESTAN® maximale Plasma-Progesteronspiegel in den meisten Fällen nach 1 bis 4 Stunden erreicht wurden (Padwick, M.L., et al., Fertil. Steril., Vol. 46, 402, 1986). Danach sanken die Spiegel stark ab, obwohl sie nach 12 Stunden noch erhöht waren. Sogar nach 84 Stunden lagen die Spiegel noch etwas über dem Ausgangswert. Eine Kinetikstudie in den USA hat frühere Ergebnisse bestätigt, welche die Bioverfügbarkeit oral aufgenommenen mikronisierten Progesterons gezeigt hat. Es wurde dort gezeigt, daß nach zwei Stunden ein Maximum erreicht wird und daß danach der Plasma-Progesteronspiegel schnell sinkt (Simon, J.A., et al., Fertil., Steril., Vol., 60, 26, 1993).

Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung von Progesteron als Trägersubstanz besteht darin, daß es nur geringe unerwünschte Nebenwirkungen hat. Oral verabreichtes Progesteron hat weder auf Plasmalipide (Jensen, J. et al., Am. J. Obstet. Gynecol., Vol. 156, 66, 1987) noch auf den Kohlenhydratstoffwechsel (Mosnier-Pudar, H. et al., Arch. Mal. Coeur, Vol. 84, 1111, 1991) einen ungünstigen Einfluß. Desweiteren wirken sich tägliche Progesterondosen von 200 mg und 300 mg nicht auf Leberenzyme (ASAT, ALAT, AFOS), die Synthese von Geschlechtshormon bindendem Globulin (SHBG) oder auf die HDL-Cholesterinspiegel aus. Obwohl die Desoxykortikosteron-Plasmaspiegel während der Behandlung mit UTROGESTAN® wesentlich steigen können, gibt es deutliche Hinweise darauf, daß die mineralcortikoiden Effekte dieses Progesteronmetaboliten durch die antimineralcortikoiden Effekte des Progesterons selbst vollständig kompensiert werden. Dies wird aus einer Vergleichsstudie ersichtlich (Corvol, P., et al., In: Progesterone and progestins, Raven Press, New York, 179, 1983), in der oral verabreichtes UTROGESTAN® die mineralcortikoiden Effekte von 9- α -Fluorohydrokortison ausgleichen konnte.

Dem Fachmann wird klar sein, daß die Zusammensetzung weitere Komponenten enthalten kann, welche das Einbringen der Nukleinsäure in eine Zelle zum Zwecke der Gentherapie unterstützen können. Insbesondere kann die Zusammensetzung auch β -Cyclodextrin, Glycerin, Lecithin oder Maiskeimöl enthalten. Beispielsweise kann die Zusammensetzung des erfindungsgemäßen Hormon-Hormonrezeptor-Nukleinsäurekomplexes Menschen oder Tieren oral in Form einer Gelatinekapsel verabreicht werden. Darin könnte Progesteron in einer 35% oder 40% β -Cyclodextrinlösung oder in Maiskeimöl oder Glycerin mit Erdnußöl in Verbindung mit Lecithin in einer Konzentration von 200-300 mg vorhanden sein.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Nukleinsäurekonstrukt, welches mindestens ein hormonresponsives Element (HRE) enthält, und insbesondere mindestens ein HRE zur Regulation der Expression eines Gens wie etwa, zum Beispiel, eines Gens, das für einen menschlichen Blutgerinnungsfaktor kodiert. Eine bevorzugte Ausführungsform besteht dann, daß das hormonresponsive Element ein steroidresponsives Element (SRE) ist. Das hormonresponsive Element ist besonders bevorzugt ein progesteronresponsives Element (PRE). Dieses Nukleinsäurekonstrukt kann als Nukleinsäure in der Stoffzusammensetzung des ersten Aspektes der Erfindung verwendet werden.

Neben den oben bereits beschriebenen HRES, SREs oder PREs kann die Nukleinsäure der vorliegenden Erfindung ferner Promotor-, "enhancer"- oder "silencer"-Sequenzen enthalten. Der Promotor kann ubiquitär oder gewebespezifisch sein. Von den ubiquitären Promotoren ist der CMV-Promotor am meisten bevorzugt. Ein gewebespezifischer Promotor wird jedoch gegenüber einem ubiquitären Promotor bevorzugt. Gewebespezifische Promotoren, die man sich im Rahmen der vorliegenden Erfindung vorstellen kann, schließen beispielsweise Alpha_1 -Antitrypsin ein. Das Nukleinsäurekonstrukt kann ferner zusätzliche Sequenzen wie z. B. das Ampicillin-Resistenzgen enthalten. Andere, dem Fachmann bekannte Reporter-Sequenzen können ebenfalls enthalten sein, wie etwa, z. B., das grüne Fluoreszenzprotein (GFP), Luciferase, β -Galactosidase oder Chloramphenicoltransferase (CAT). Als Enhancersequenz sind das SV40-Intron und das SV40-Poly-A besonders bevorzugt. Ein bevorzugtes Nukleinsäurekonstrukt enthält nacheinander vom 5'- zum 3'-Ende: ein PRE, ein CMV-Promotor, ein interessierendes Gen, das SV40-Intron und eine SV40-Poly-A-Enhancersequenz und ein Ampicillin-Resistenzgen.

Das interessierende Gen kann ausgewählt werden aus denen, welche für Proteine kodieren, die in verschiedenen genetischen Defekten fehlen oder an Zuständen beteiligt sind, die im Zusammenhang mit unverhältnismäßigen Antworten auf Hormonsignale stehen, beispielsweise hormonabhängige Krebsformen wie etwa Brustkrebs, Eierstockkrebs und endometriale Krebsformen sowie Prostatakrebs. Das interessierende Gen kann auch dazu verwendet werden, ein defektes Gen, welches zu genetischen Erkrankungen wie Hämophilie, der von Willebrand-Erkrankung oder zystischer Fibrose führt, zu ersetzen. Das interessierende Gen umfaßt auch Mutationen solcher Gene oder ein Gen, welches für ein Fusionsprodukt kodiert. Das Nukleinsäurekonstrukt der vorliegenden Erfindung kann mehr als ein interessierendes Gen umfassen.

Insbesondere kann das interessierende Gen Gene für einen Blutgerinnungsfaktor, vorzugsweise einen menschlichen Blutgerinnungsfaktor, ersetzen. Die Gene, die für Faktor VIII und Faktor IX kodieren, welche im Zusammenhang mit Hämophilie A bzw. B stehen, sind gute Kandidaten für die Erfindung. Andere Kandidaten schließen das Gen, das für von Willebrand-Faktor, Faktor N, Faktor X oder Protein C kodiert, mit ein.

Andere nützliche Gene schließen, ohne auf diese beschränkt zu sein, Gene für Hormone mit ein, wie etwa die Gene, die für Insulin, Parathormon, Luteinisierendes Hormon Releasing Factor (LHRH), Alpha- und Beta-Seminalinhibin und menschliches Wachstumshormon kodieren; Hormonrezeptorgene wie den Glukokortikoidrezeptor, den Östrogenrezeptor, den Progesteronrezeptor, den Retinsäurerezeptor; Wachstumsfaktoren wie etwa vascular endothelial growth factor (VEGF), nerve growth factor, epidermal growth factor; Gene für Enzyme; Gene, die für Zytokine oder Lymphokine wie z. B. Interferon kodieren, granulocytic macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), colony stimulating factor-1 (CSF-1), tumor necrosis factor (TNF), sowie Erythropoietin (EPO); Gene, die für Inhibitorsubstanzen wie etwa Alpha_1 -Antitrypsin kodieren und Gene, die für Substanzen kodieren, die als Medikamente wirken, beispielsweise Gene, die für die Diphtherie- und Cholera Toxine, Rizin oder Kobragift (cobra venom factor) kodieren. Des weiteren können auch Antisense-Sequenzen als genetisches Material verabreicht werden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft Vektoren, die die Nukleinsäurekonstrukte der vorliegenden Erfindung enthalten. Diese Vektoren können in der Stoffzusammensetzung der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Vorzugsweise ist die Nukleinsäuresequenz, die in der vorliegenden Erfindung verwendet wird, jedoch linear anstatt zirkulär. Die Vektoren können zur transienten, permanenten oder episomalen Expression der Nukleinsäure in dem Nukleinsäurekonstrukt in der Lage sein. Wie oben erwähnt, kann das Nukleinsäurekonstrukt ferner zusätzliche Elemente enthalten.

Ausführungsformen der Erfindung schließen ferner transfizierte und transformierte Zellen, die diese Vektoren und/oder Nukleinsäurekonstrukte enthalten, mit ein. Im Zusammenhang mit dieser Erfindung ist eine transfizierte Zelle eine solche, in die Fremd-DNA inkorporiert worden ist. Transfektionsmethoden können Mikroinjektion, CaPO_4 -Fällung, Elektroporation, Liposomenfusion, oder Methoden mittels der "gene gun" einschließen. Am meisten bevorzugt ist die Transfektion mittels Elektroporation.

Transformation bezeichnet das Einbringen genetischen Materials in eine Zelle, etwa die erfindungsgemäßen Vektoren oder Nukleinsäurekonstrukte, wodurch die Zelle transient, stabil, oder permanent so verändert wird, daß sie ein spezifisches Genprodukt exprimiert oder auf eine andere Weise hinsichtlich ihrer Expression verändert ist. Transformation kann durch in vivo oder in vitro Techniken erreicht werden, obgleich eine in vivo Transformation bevorzugt ist.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind pharmazeutische Zusammensetzungen, die eine therapeutisch wirksame Dosis der erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte und ein Hormon enthalten. Das Hormon ist vorzugsweise ein Steroid, und Progesteron ist, wie oben beschrieben, besonders bevorzugt. Die Dosis ist abhängig von dem zu behandelnden Zustand, den Parametern des Patienten und dem angestrebten Ergebnis. Die Bestimmung der Dosis liegt innerhalb des Erfahrungsbereichs des Fachmanns.

Die pharmazeutische Zusammensetzung (bzw. die Stoffzusammensetzung, das Nukleinsäurekonstrukt oder der Vektor) der vorliegenden Erfindung kann oral, intravenös, intramuskulär, subkutan, topisch oder durch die "gene gun" ver-

abreicht werden. Bevorzugt ist die orale Verabreichung unter Verwendung eines mikronisierten Hormons. Die Verabreichung kann systemisch erfolgen oder auf ein bestimmtes Gewebe abzielen.

Die Erfindung umfaßt ferner ein Verfahren zur Einführung eines Nukleinsäurekonstruktes, das für ein interessierendes Gen, beispielsweise einen menschlichen Blutgerinnungsfaktor, kodiert, in eine Zelle, um den Blutgerinnungsfaktor in dieser Zelle zu exprimieren. Bei diesem Verfahren wird die Nukleinsäure, die für einen menschlichen Blutgerinnungsfaktor kodiert, mit einem Nukleinsäurekonstrukt kombiniert, das mindestens ein hormonresponsives Element (HRE), vorzugsweise ein progesteronresponsives Element, umfaßt.

Die Mischung der Nukleinsäure, welche an den Hormon-Hormonrezeptorkomplex gebunden ist, mit einem Überschuß des Hormons, vorzugsweise Progesteron, wird verwendet, um die Nukleinsäure mittels verschiedener Methoden, die dem Fachmann bekannt und oben unriß sind, in eine Zelle zu bringen. Die Aufnahme in die Zelle wird durch die Wechselwirkung des Hormons auf der Ebene der Zellmembran stimuliert. Das Hormon oder Steroid interagiert mit der Lipiddoppelschicht der Zellmembran nicht nur aufgrund der Perturbation der Membran; sondern auch durch Aktivierung bestimmter hormon- oder steroidsensitiver Membranrezeptoren. Dies ist für Progesteron und andere Steroide nachgewiesen worden. Ferner ist es auch bekannt, daß Hormone mittels Diffusion die Zellmembran passieren können. In der vorliegenden Erfindung sollte die Nukleinsäure, die an den Hormon-Hormonrezeptorkomplex gebunden ist, im Zuge des Diffusionsprozesses durch die Membran transportiert werden.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zur Behandlung eines Blutgerinnungsdefektes, durch Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Dosis der erfindungsgemäßen Stoffzusammensetzung an einen Organismus. Dieses Verfahren beinhaltet die bereits diskutierten Überlegungen hinsichtlich der Verabreichung und der Dosierung.

Zur Illustration der technischen Aspekte der vorliegenden Erfindung wurden Experimente durchgeführt. Diese Experimente sind in den Beispielen II bis IV beschrieben.

Im folgenden wird die vorliegende Erfindung anhand von Beispielen erläutert. Der Fachmann wird leicht erkennen, daß die Erfindung nicht auf diese Beispiele beschränkt ist.

Beispiel I

Konstruktion der Vektoren

Herstellung des Vektors pTGFG1

Der Vektor pUC19 (MBI Fermentas) wurde mit XbaI verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und religiert. Dieser XbaI-deletierte Vektor wurde dann mit EcoRI verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und religiert, um die EcoRI-Schnittstelle zu deletieren. Um eine XbaI Schnittstelle in die SacI-Schnittstelle dieses Vektors einzufügen, wurde dieser mit SacI verdaut, mit T4-Polymerase behandelt, mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert und mit dem XbaI-Linker CTCTAGAG (Biolabs #1032) ligiert. Eine weitere XbaI-Schnittstelle wurde dadurch eingeführt, daß der neu hergestellte Vektor mit HindIII verdaut wurde, mit Klenow behandelt, mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert und mit dem XbaI-linker CTCTAGAG (Biolabs #1032) ligiert wurde. Dieser Vektor wurde pUC19/X genannt.

Um die XbaI-Schnittstelle in dem Vektor pHGFP-S65T (Clontech) zu deletieren, wurde dieser Vektor mit XbaI verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und zu dem so erhaltenen Vektor pGFP/0 religiert. Ein 2,3 kb Fragment, welches das GFP-Gen enthielt, wurde isoliert, nachdem pGFP/0 mit MluI verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und mit BamHI verdaut worden war. Dieses Fragment wurde in den multiplen Klonierungsbereich des Vektors pUC19/X eingefügt, nachdem dieser mit SalI verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und mit BamHI verdaut worden war. Der resultierende Vektor wurde pTGFG1 benannt (Abb. 1).

Herstellung des Inserts PRE (ds)

Die Oligonukleotide (Metablon) PRE-S (5'-GGG GTA CCA GCT TCG TAG CTA GAA CAT CAT GTT CTG GGA TAT CAG CTT CGT AGC TAG AAC ATC ATG TTC TGG TAC CCC-3') (SEQ ID No. 3) und PRE-AS (5'-GGG GTA CCA GAA CAT GAT GTT CTA GCT ACG AAG CTG ATA TCC CAG AAC ATG ATG TTC TAG CTA CGA AGC TGG TAC CCC-3') (SEQ. ID No. 4) wurden hybridisiert und mittels Kinasereaktion phosphoryliert, wodurch die Inserts PRE (ds) entstanden.

Herstellung des Vektors pTGFG4

Der Vektor pTGFG1 wurde mit PstI verdaut, mit T4-Polymerase behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Er wurde dann mit dem PRE(ds)-Fragment ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG4 genannt (Abb. 2).

Herstellung des Vektors pTGFG5

Der Vektor pTGFG1 wurde mit EcoO109I verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Er wurde anschließend mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG5 genannt (Abb. 3).

Herstellung des Vektors pTGFG6

Der Vektor pTGFG1 wurde mittels EheI verdaut und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Dann wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG6 genannt (Abb. 4).

Herstellung des Vektors pTGFG7

Der Vektor pTGFG1 wurde mittels KpnI verdaut, mit T4-Polymerase behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG7 genannt (Abb. 5).

5

Herstellung des Vektors pTGFG8

Der Vektor pTGFG7 wurde mittels EheI verdaut und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG8 genannt (Abb. 6).

10

Herstellung des Vektors pTGFG9

Der Vektor pTGFG7 wurde mittels SapI verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG9 genannt (Abb. 7).

15

Herstellung des Vektors pTGFG10

Der Vektor pTGFG7 wurde mittels EcoO109I verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Fragment ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG10 genannt (Abb. 8).

20

Herstellung des Vektors pTGFG11

Der Vektor pTGFG7 wurde mittels PstI verdaut, mit T4-Polymerase behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG11 genannt (Abb. 9).

25

Herstellung des Vektors pTGFG13

Der Vektor pTGFG6 wurde mittels EcoO109I verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG13 genannt (Abb. 10).

30

Herstellung des Vektors pTGFG14

Der Vektor pTGFG6 wurde mittels PstI verdaut, mit T4-Polymerase behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG14 genannt (Abb. 11).

35

40

Herstellung des Vektors pTGFG15

Der Vektor pTGFG5 wurde mittels SapI verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG15 genannt (Abb. 12).

45

Herstellung des Vektors pTGFG16

Der Vektor pTGFG5 wurde mittels PstI verdaut, mit T4-Polymerase behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG16 genannt (Abb. 13).

50

Herstellung des Vektors pTGFG18

Der Vektor pTGFG9 wurde mittels EcoO109I verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG18 genannt (Abb. 14).

55

Herstellung des Vektors pTGFG19

Der Vektor pTGFG10 wurde mittels EheI verdaut und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG19 genannt (Abb. 15).

60

Herstellung des Vektors pTGFG20

Der Vektor pTGFG11 wurde mittels EcoO109I verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG20 genannt (Abb. 16).

65

genannt (Abb. 16).

Herstellung des Vektors pTGFG21

- 5 Der Vektor pTGFG15 wurde mittels *EheI* verdaut und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRB(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG21 genannt (Abb. 17).

Herstellung des Vektors pTGFG22

- 10 Der Vektor pTGFG14 wurde mittels *EcoO109I* verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG22 genannt (Abb. 18).

Herstellung des Vektors pTGFG23

- 15 Der Vektor pTGFG11 wurde mittels *EheI* verdaut und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG23 genannt (Abb. 19).

Herstellung des Vektors pTGFG24

- 20 Der Vektor pTGFG9 wurde mittels *PstI* verdaut, mit T4-Polymerase behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG24 genannt (Abb. 20).

Herstellung des Vektors pTGFG25

- 25 Der Vektor pTGFG14 wurde mittels *SapI* verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG25 genannt (Abb. 21).

Herstellung des Vektors pTGFG26

- 30 Der Vektor pTGFG16 wurde mittels *SapI* verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG26 genannt (Abb. 22).

Herstellung des Vektors pTGFG27

- 40 Der Vektor pTGFG9 wurde mittels *EheI* verdaut und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG27 genannt (Abb. 23).

Herstellung des Vektors pTGFG28

- 45 Der Vektor pTGFG18 wurde mittels *EheI* verdaut und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG28 genannt (Abb. 24).

Herstellung des Vektors pTGFG29

- 50 Der Vektor pTGFG25 wurde mittels *EcoO109I* verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG29 genannt (Abb. 25).

Herstellung des Vektors pTGFG30

- 55 Der Vektor pTGFG27 wurde mittels *PstI* verdaut, mit T4-Polymerase behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Fragment ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG30 genannt (Abb. 26).

Herstellung des Vektors pTGFG31

- 60 Der Vektor pTGFG24 wurde mittels *EcoO109I* verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG31 genannt (Abb. 27).

Herstellung des Vektors pTGFG32

- 65 Der Vektor pTGFG19 wurde mittels *PstI* verdaut, mit T4-Polymerase behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG32 genannt

(Abb. 28).

Herstellung des Vektors pTGFG33

Der Vektor pTGFG28 wurde mittels PstI verdaut, mit T4-Polymerase behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde er mit dem PRE(ds)-Insert ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGFG33 genannt (Abb. 29).

Herstellung des Vektors pTGFG2

Der Vektor pUC19 (MBI Fermentas) wurde mit SalI verdaut, mit Klenow-Enzym behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Er wurde mit dem NotI-Linker GCGGCCGC (Biolabs # 1045) ligiert, der entstehende Vektor wurde pUC19/N genannt.

Ein 1,4 kb Fragment, welches den offenen Leserahmen des menschlichen Blutgerinnungsfaktors IX enthielt und von einer menschlichen cDNA-Bank isoliert worden war, wurde in die PstI-Schnittstelle des Vektors pUC19/N eingefügt, der mit PstI verdaut, mit T4-Polymerase behandelt und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert worden war. Aus dem resultierenden Vektor pUC19/N-FIX wurde ein 1,4 kb Fragment, welches den offenen Leserahmen des menschlichen Blutgerinnungsfaktors IX enthielt, mit Hilfe eines Doppelverdaus mit HindIII und NotI herausgeschnitten. Dieses Fragment wurde mit dem 4,3 kb Fragment des HindIII/NotI-doppelverdauten Vektors pTGFG1 ligiert. Der entstehende Vektor wurde pTGFG2 genannt (Abb. 30).

Herstellung des Vektors pTGFG34

Aus dem Vektor pUC19/N-FIX wurde mittels eines HindIII/NotI-Doppelverdaus ein 1,4 kb Fragment ausgeschnitten, welches den offenen Leserahmen des menschlichen Blutgerinnungsfaktors IX enthielt. Dieses Fragment wurde mit dem 4,3 kb Fragment des HindIII/NotI-doppelverdauten Vektors pTGFG3 ligiert. Der entstehende Vektor wurde pTGFG34 genannt (Abb. 31).

Herstellung des Vektors pTGFG35

Aus dem Vektor pUC19/N-FIX wurde durch HindIII/NotI-Doppelverdau ein 1,4 kb Fragment ausgeschnitten, welches den offenen Leserahmen des menschlichen Blutgerinnungsfaktors IX enthielt. Dieses Fragment wurde mit dem 4,3 kb Fragment des HindIII/NotI-doppelverdauten Vektors pTGFG4 ligiert. Der entstehende Vektor wurde pTGFG35 genannt (Abb. 32).

Herstellung des Vektors pTGFG36

Aus dem Vektor pUC19/N-FIX wurde durch HindIII/NotI-Doppelverdauung ein 1,4 kb Fragment ausgeschnitten, welches den offenen Leserahmen des menschlichen Blutgerinnungsfaktors IX enthielt. Dieses Fragment wurde mit dem 4,3 kb Fragment des HindIII/NotI-doppelverdauten Vektors pTGFG5 ligiert. Der entstehende Vektor wurde pTGFG36 genannt (Abb. 33). Dieser Vektor wird für die Einführung von Faktor IX in die Zelle bevorzugt. Seine DNA-Sequenz ist in Abb. 46 dargestellt.

Herstellung des Vektors pTGFG37

Aus dem Vektor pUC19/N-FIX wurde durch HindIII/NotI-Doppelverdau ein 1,4 kb Fragment ausgeschnitten, welches den offenen Leserahmen des menschlichen Blutgerinnungsfaktors IX enthielt. Dieses Fragment wurde mit dem 4,3 kb Fragment des HindIII/NotI-doppelverdauten Vektors Vektors pTGFG6 ligiert. Der entstehende Vektor wurde pTGFG37 genannt (Abb. 35).

Herstellung des Vektors pTGFG38

Aus dem Vektor pUC19/N-FIX wurde durch HindIII/NotI-Doppelverdau ein 1,4 kb Fragment ausgeschnitten, welches den offenen Leserahmen des menschlichen Blutgerinnungsfaktors IX enthielt. Dieses Fragment wurde mit dem 4,3 kb Fragment des HindIII/NotI-doppelverdauten Vektors pTGFG7 ligiert. Der entstehende Vektor wurde pTGFG38 genannt (Abb. 35).

Herstellung des Vektors pTGFG53

Aus dem Vektor pUC19/N-FIX wurde durch HindIII/NotI-Doppelverdau ein 1,4 kb Fragment ausgeschnitten, welches den offenen Leserahmen des menschlichen Blutgerinnungsfaktors IX enthielt. Dieses Fragment wurde mit dem 4,3 kb Fragment des HindIII/NotI-doppelverdauten Vektors pTGFG20 ligiert. Der entstehende Vektor wurde pTGFG53 genannt (Abb. 36).

Herstellung des Vektors pTGFG64

Aus dem Vektor pUC19/N-FIX wurde durch HindIII/NotI-Doppelverdauung ein 1,4 kb Fragment ausgeschnitten, welches den offenen Leserahmen des menschlichen Blutgerinnungsfaktors IX enthielt. Dieses Fragment wurde mit dem

4,3 kb Fragment des HindIII/NotI-doppelverdauten Vektors pTGF633 ligiert. Der entstehende Vektor wurde pTGF64 genannt (**Abb. 37**).

Herstellung des Inserts ALLG(ds)

Die Oligonukleotide (Metablon) ALLG1/1 (5'-AGC TTG ACC TCG AGC AAG C-3') (SEQ. ID NO: 6) und ALLG2 (5'-GGC CGC TTG CTC GAG GTC A-3') (SEQ. ID NO: 7) wurden hybridisiert und mittels Kinasereaktion phosphoryliert, das entstehende Insert wurde ALLG(ds) genannt. Dieses Insert ALLG(ds) wurde zu dem Zwecke konstruiert, in einem beliebigen Vektor eine Sequenz mit einem multiplen Klonierungsbereich für die mögliche Einfügung anderer Transgene einzuführen.

Herstellung des Vektors pTGF60

Der Vektor pTGF61 wurde mit HindIII und NotI doppelverdaut. Das 4,3 kb Fragment wurde mit dem Insert ALLG(ds) ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGF60 genannt (**Abb. 38**).

Herstellung des Vektors pTGF66

Der Vektor pTGF64 wurde mit HindIII und NotI doppelverdaut. Das 4,3 kb Fragment wurde mit dem Fragment ALLG(ds) ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGF66 genannt (**Abb. 39**).

Herstellung des Vektors pTGF67

Der Vektor pTGF65 wurde mit HindIII und NotI doppelverdaut. Das 4,3 kb Fragment wurde mit dem Insert ALLG(ds) ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGF67 genannt (**Abb. 40**). Dieser Vektor ist für die Verabreichung jedweden Genes, welches in die Klonierungsstelle eingefügt ist, bevorzugt; seine DNA-Sequenz ist in **Abb. 47** dargestellt.

Herstellung des Vektors pTGF68

Der Vektor pTGF66 wurde mit HindIII und NotI doppelverdaut. Das 4,3 kb Fragment wurde mit dem Insert ALLG(ds) ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGF68 genannt (**Abb. 41**).

Herstellung des Vektors pTGF69

Der Vektor pTGF67 wurde mit HindIII und NotI doppelverdaut. Das 4,3 kb Fragment wurde mit dem Insert ALLG(ds) ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGF69 genannt (**Abb. 42**).

Herstellung des Vektors pTGF82

Der Vektor pTGF60 wurde mit HindIII und NotI doppelverdaut. Das 4,3 kb Fragment wurde mit dem Insert ALLG(ds) ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGF82 genannt (**Abb. 43**).

Herstellung des Vektors pTGF95

Der Vektor pTGF633 wurde mit HindIII und NotI doppelverdaut. Das 4,3 kb Fragment wurde mit dem Fragment ALLG(ds) ligiert, der entstehende Vektor wurde pTGF95 genannt (**Abb. 44**).

Beispiel II

Isolierung von humaner Faktor IX cDNA

Faktor IX cDNA wurde unter Verwendung zweier Primer, die mit dem Start bzw. Stop-Kodon des Faktor IX Leserahmens überlappten, aus menschlicher Leber-cDNA (Clontech) amplifiziert. Das entstehende 1387 Basenpaarfragment enthielt den vollständigen offenen Leserahmen. Schnittstellen für EcoRI (upstream) und BamHI (downstream) wurden an das Ende des jeweiligen Primers gesetzt, um die Klonierung zu erleichtern. Die Amplifizierung erfolgte mit Pwo Polymerase (Boehringer Mannheim) in einem 50 µl Reaktionsvolumen [10 mM Tris HCl pH 8,85, 25 mM KCl, 5 mM Ammoniumsulfat, 2 mM Magnesiumsulfat] mit 30 Inkubationszyklen (1 min. 96°C, 1 min. 60°C, 2 min. 72°C, gefolgt von einem abschließenden Verlängerungsschritt von 10 min bei 72°C).

Die Reaktionsprodukte wurden in die EcoRI- und BamHI-Schnittstellen von pUC19 ligiert und zur Transformation von E. coli DH5-a verwendet. Positive Klone wurden selektiert. Die Richtigkeit der Sequenzen wurde durch zyklische Sequenzierung (Amersham) von beiden Enden mit markierten Primern (IR-700) und automatisierter Analyse mit Hilfe des LiCor Sequenzierungssystems (MWG, Biotech) bestätigt.

Die folgenden Primer wurden verwendet:

gGAATTCcgcaaaaggttATGCAGCGCGTGAACATGATCATGGC(upstream)(SEQ. ID NO:8)

cgcGGATCCATTAAGTGAGCTTTGTTTTTTCCTTAATCC (downstream)(SEQ. ID NO:9)

Beispiel III

Expression und Quantifizierung des Markerproteins GFP ("Green Fluorescent Protein")

HeLa-Zellen wurden durch Elektroporation mit den Plasmiden pTGFG5 bzw. pTGFG20 transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden geerntet, die Zellpellets homogenisiert und in einem Puffer lysiert, der phosphatgepufferte Kochsalzlösung (pH 7,5) und 10 mM PMSF enthielt. Die Konzentration des grünen Fluoreszenzproteins (GFP) in dem Zellhomogenisat wurde durch kompetitiven ELISA bestimmt.

Zu diesem Zweck wurde GFP in einer definierten Konzentration auf Mikrotiterplatten aufgebracht. Anschließend wurden GFP-Proben in Gegenwart von anti-GFP-Antikörper hinzugefügt. Nach diversen Waschschritten wurde ein markierter zweiter Antikörper hinzugefügt, um die Detektion des ersten Antikörpers zu ermöglichen. Die Farbreaktion wurde photometrisch gemessen (Extinktion). Allgemein war umso weniger Antikörper übrig, um an das aufgebrachte GFP zu binden, je mehr GFP hinzugefügt worden war.

Demzufolge korreliert eine verminderte Extinktion mit einer höheren GFP-Konzentration in der Probe.

Durch lineare Regression wurde eine GFP-Konzentrationskurve bestimmt (Abb. 47), wobei bovines Serumalbumin (BSA) als Standard verwendet wurde. Dabei wurde ein Durchschnittswert von 2,4 µg GFP/ml im Falle von pTGFG5 (1 PRE) und 5,2 µg GFP/ml im Falle von pTGFG20 (3 PREs) gefunden.

Abb. 48a-d zeigen mikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellkulturen nach der Transfektion mit pTGFG5 (Abb. 48a und b) bzw. TGFG20 (Abb. 48c und d).

Abb. 46a und c zeigen lichtmikroskopische Aufnahmen als Kontrolle, und Abb. 48b und d zeigen die entsprechenden Ausschnitte in Fluoreszenzaufnahme. Standardmäßig haben mehr als 50% der Zellen GFP exprimiert, was auf eine sehr effiziente Expression hinweist, wobei in Gegenwart eines einzigen PRE eine effizientere Expression erfolgte.

Beispiel IV

Quantifizierung von menschlichem Faktor IX mittels ELISA

HeLa-Zellen wurden entweder durch Elektroporation oder durch Verwendung des Liposomreagenzes DOTAP (Boehringer Mannheim) mit den Plasmiden pTGFG36, pTGFG53 und pTGFG64 transfiziert. Diese Plasmide enthalten die cDNA des menschlichen Blutgerinnungsfaktors IX. Rekombinanter menschlicher Blutgerinnungsfaktor IX wurde in den Zellkulturüberstand sezerniert und mit Hilfe einer Sandwich-ELISA-Methode quantifiziert.

0,11 M Natriumcitrat und 10 mM PMSF wurden zugegeben, um die Degradation des menschlichen Faktors IX zu verhindern. Die Konzentrationsbestimmung des exprimierten humanen Faktors IX wurde unter Verwendung des enzym-immunologischen in vitro Verfahrens "Asserachrom IX:AG" von Boehringer-Mannheim durchgeführt. Als Standard wurde der Faktor IX Standard von Octapharma AG in wässrigen Lösungen von 28 IU/ml verwendet.

In sechs verschiedenen Transfektionsexperimenten, in denen HeLa-Zellen mit Plasmiden transfiziert und die menschliche Faktor IX-cDNA (pTGFG36, 53 und 64) unter Verwendung von Elektroporation oder des Lipid-Transfektionsreagenzes (DOTAP, Boehringer Mannheim) transfiziert wurden, wurde ein Konzentrationsbereich von 3-25 ng/ml humanen Gerinnungsfaktors IX erreicht.

Patentansprüche

1. Eine Stoffzusammensetzung, die eine Nukleinsäure enthält, die ein hormonresponsives Element (HRE) umfaßt, wobei dieses hormonresponsive Element an einen Hormon-Hormonrezeptorkomplex gekoppelt ist.
2. Eine Stoffzusammensetzung gemäß Anspruch 1, wobei die Nukleinsäure zusätzlich ein Gen enthält, das für einen Blutgerinnungsfaktor kodiert.
3. Eine Stoffzusammensetzung gemäß Anspruch 2, wobei der menschliche Blutgerinnungsfaktor aus der Gruppe der Faktoren VIII, IX und von Willebrand Faktor (vWF) ausgewählt ist.
4. Eine Stoffzusammensetzung gemäß Anspruch 2, wobei das hormonresponsive Element ein steroidresponsives Element (SRE) ist.
5. Eine Stoffzusammensetzung gemäß Anspruch 4, wobei das steroidresponsive Element (SRE) ein progesteronresponsives Element (PRE) ist.
6. Eine Stoffzusammensetzung gemäß Anspruch 1, wobei der Komplex ein Steroid-Steroidrezeptorkomplex ist.
7. Eine Stoffzusammensetzung gemäß Anspruch 6, wobei der Rezeptor ein Progesteronrezeptor und das Steroid Progesteron ist.
8. Eine Stoffzusammensetzung gemäß Anspruch 3, wobei der menschliche Blutgerinnungsfaktor Faktor IX ist.
9. Eine Stoffzusammensetzung gemäß Anspruch 7, wobei der menschliche Blutgerinnungsfaktor Faktor IX ist.
10. Ein Nukleinsäurekonstrukt, das mindestens ein hormonresponsives Element (HRE) für die Regulation der Ex-

pression eines Gens, das für einen menschlichen Blutgerinnungsfaktor kodiert, enthält.

11. Ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 10, wobei das hormonresponsive Element ein steroidresponsives Element (SRE) ist.

12. Ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 11, wobei das steroidresponsive Element ein progesteronresponsives Element (PRE) ist.

13. Ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 10, wobei der menschliche Blutgerinnungsfaktor aus der Gruppe der Faktoren VIII, IX und von Willebrand Faktor (vWF) ausgewählt ist.

14. Ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 10, das ferner einen gewebespezifischen Promotor enthält.

15. Ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 10, wobei das hormonresponsive Element (HRE) ein progesteronresponsives Element (PRE) und der Blutgerinnungsfaktor Faktor IX ist.

16. Ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 15, das ferner einen gewebespezifischen Promotor enthält.

17. Ein Vektor, der ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 10 enthält.

18. Ein Vektor, der ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 11 enthält.

19. Ein Vektor, der ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 12 enthält.

20. Ein Vektor, der ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 13 enthält.

21. Ein Vektor, der ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 14 enthält.

22. Ein Vektor, der ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 15 enthält.

23. Ein Vektor, der ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 16 enthält.

24. Eine Zelle, die mit einem Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 10 transfiziert ist.

25. Eine Zelle, die durch ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 10 transformiert wurde.

26. Eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine therapeutisch wirksame Dosis eines Nukleinsäurekonstrukts gemäß Anspruch 10 und ein Hormon enthält.

27. Eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine therapeutisch wirksame Dosis eines Nukleinsäurekonstrukts gemäß Anspruch 15 und Progesteron enthält.

28. Eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine therapeutisch wirksame Dosis einer Stoffzusammensetzung gemäß Anspruch 1 enthält.

29. Eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine therapeutisch wirksame Dosis einer Stoffzusammensetzung gemäß Anspruch 9 enthält.

30. Ein Verfahren zur Einführung einer Nukleinsäure, die für ein zu exprimierendes Gen kodiert, in eine Zelle, umfassend die Bereitstellung des Stoffgemisches gemäß Anspruch 1 an einen Organismus, so daß das Hormon des Gemisches die Zellmembran durch Diffusion durchquert und die an den Hormon-Hormonrezeptorkomplex gekoppelte Nukleinsäure durch die Membran und in die Zelle transportiert.

31. Ein Verfahren gemäß Anspruch 30, wobei eine Nukleinsäure, die für menschlichen Faktor IX kodiert, in die Zelle gebracht wird.

32. Ein Verfahren zur Behandlung eines Blutgerinnungsdefektes, das die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge einer Stoffzusammensetzung gemäß Anspruch 1 an einen Organismus umfaßt.

33. Ein Verfahren zur Behandlung von Hämophilie B, das die Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge einer Stoffzusammensetzung gemäß Anspruch 9 an einen Organismus umfaßt.

Hierzu 58 Seite(n) Zeichnungen

Abbildung 1

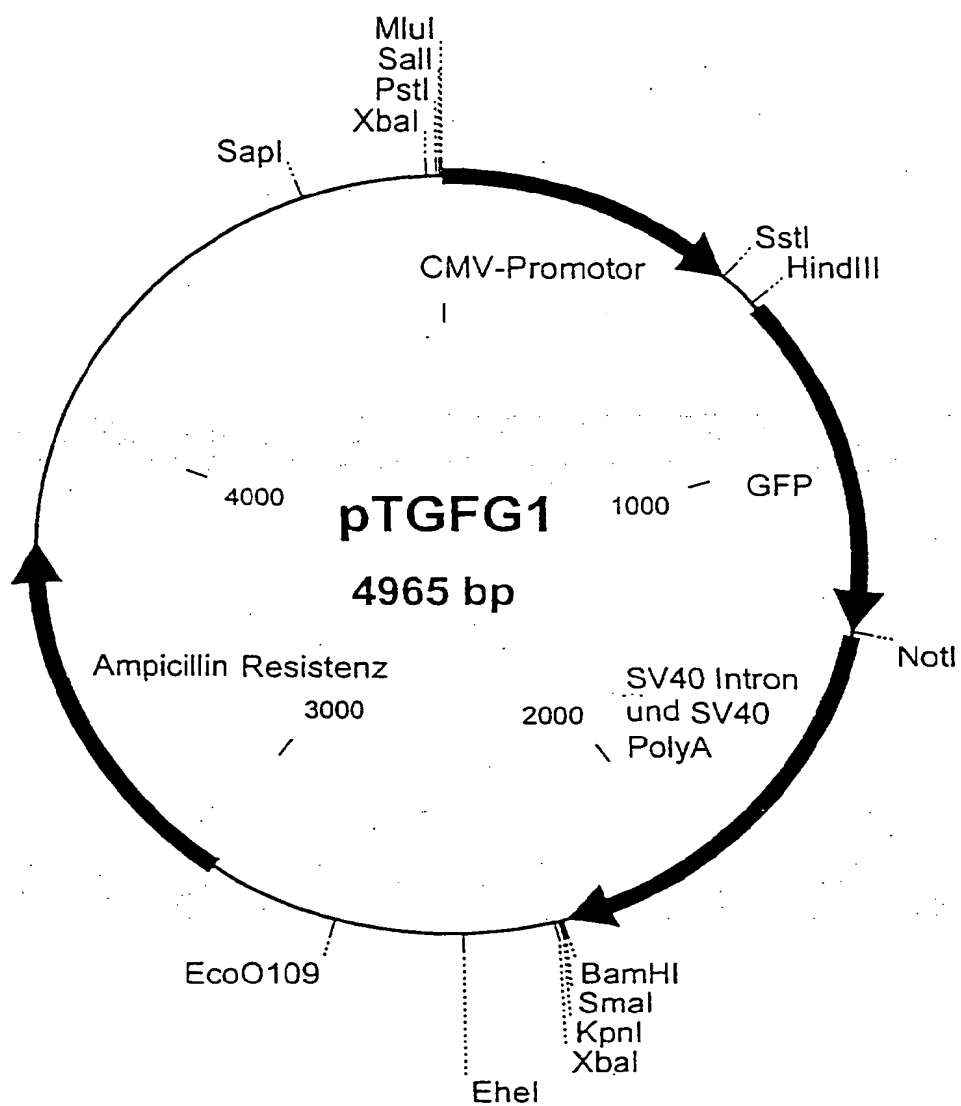


Abbildung 2

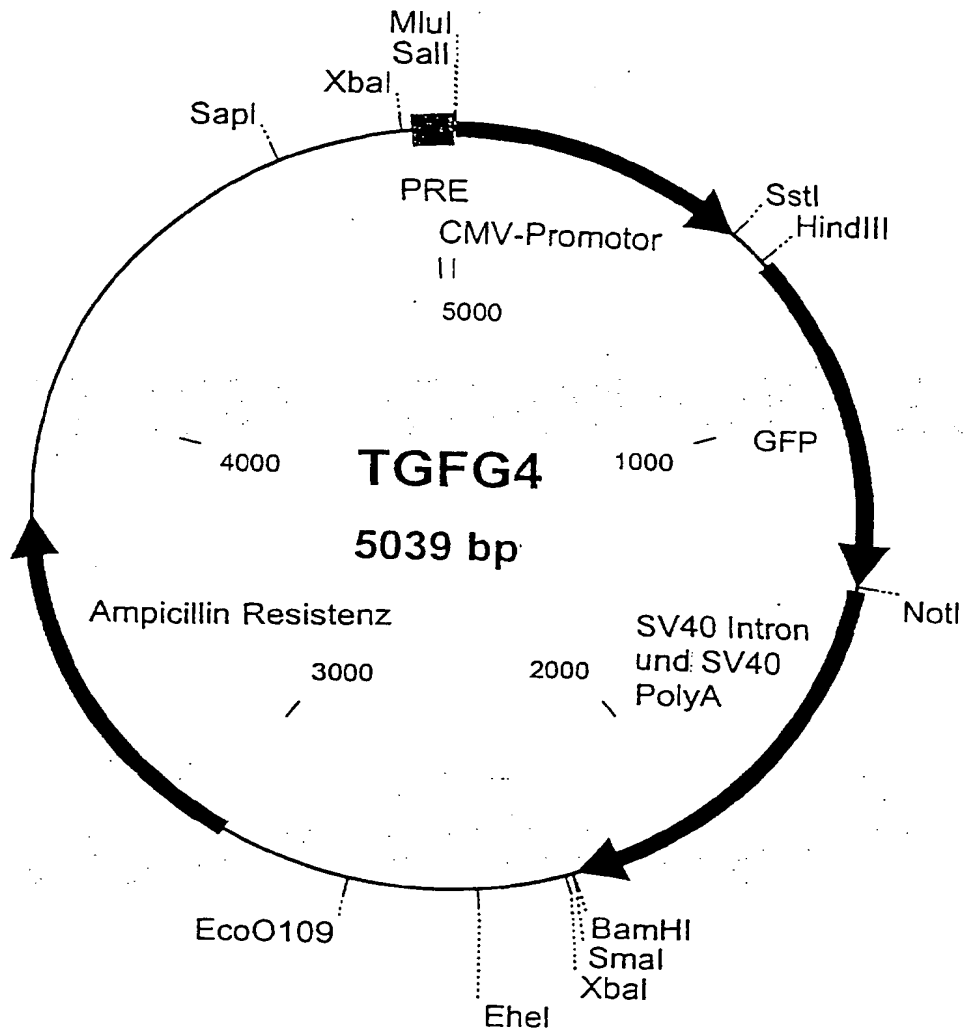


Abbildung 3

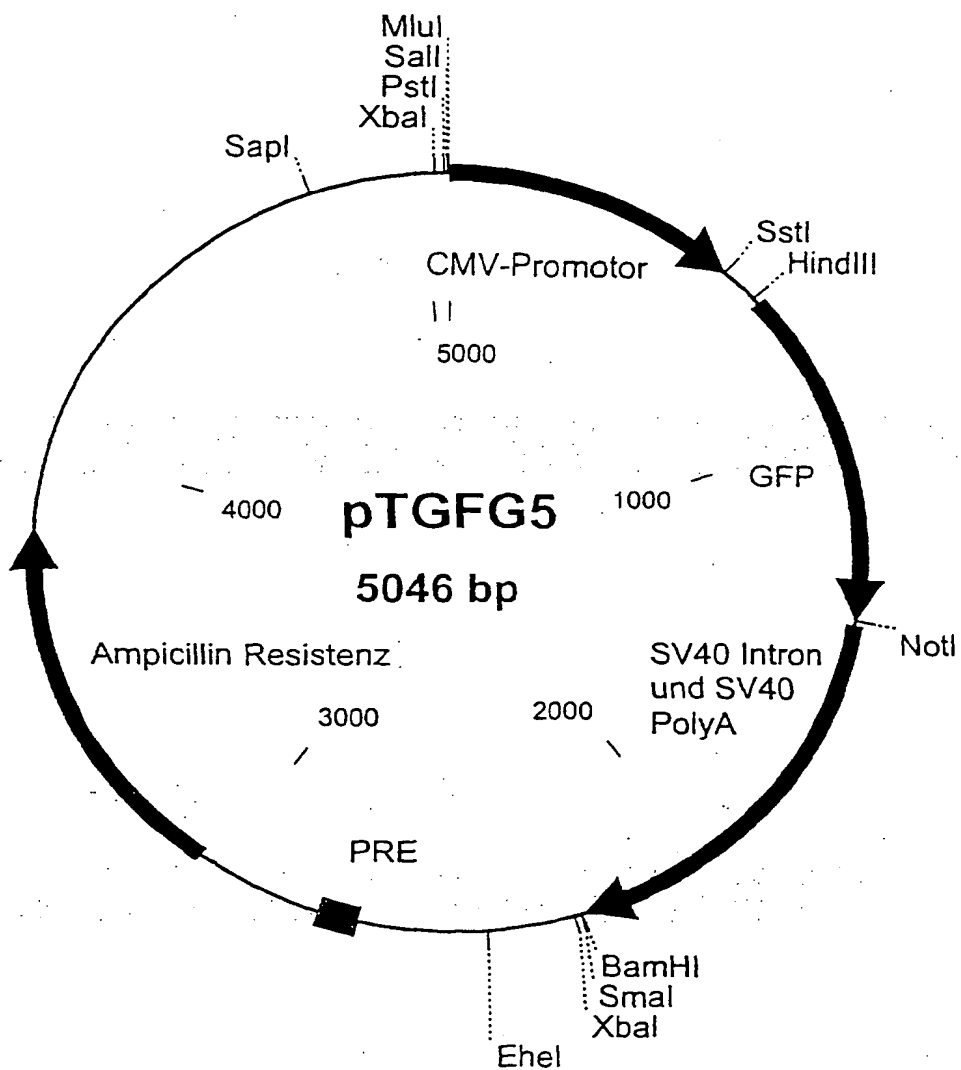


Abbildung 4

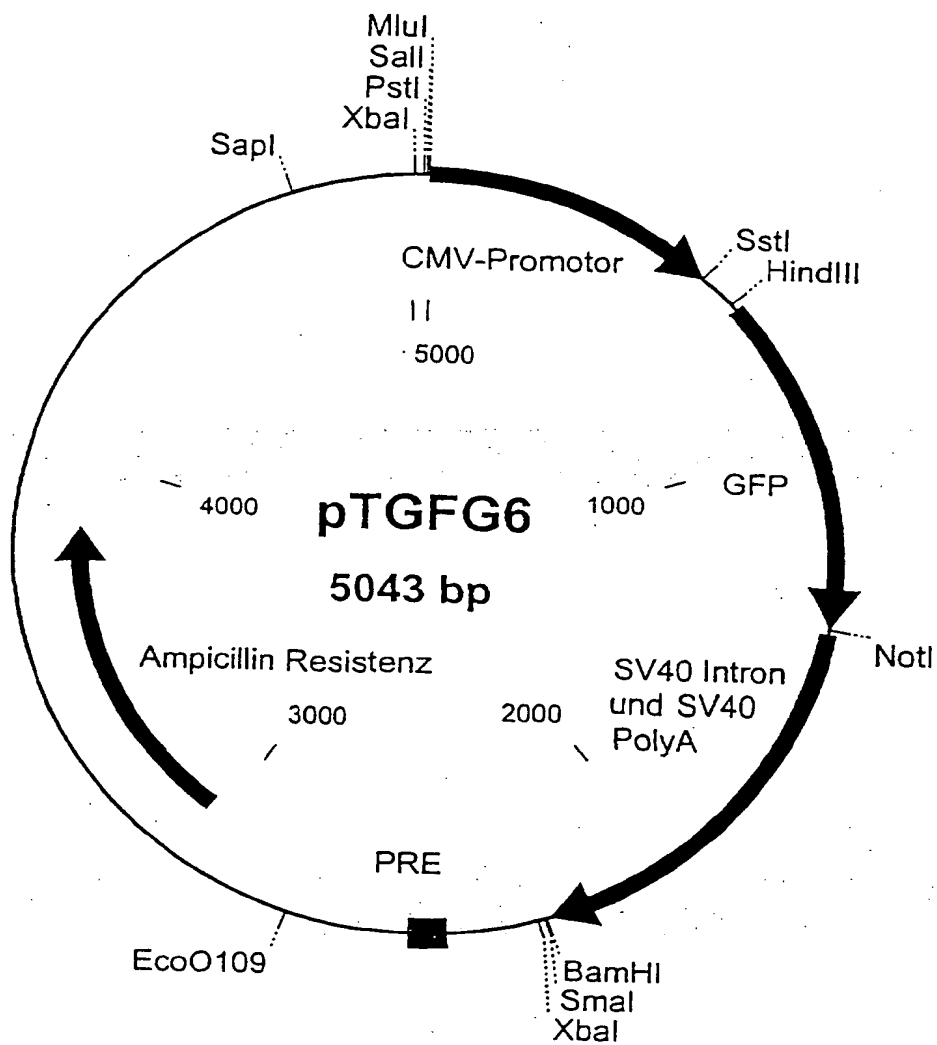


Abbildung 5

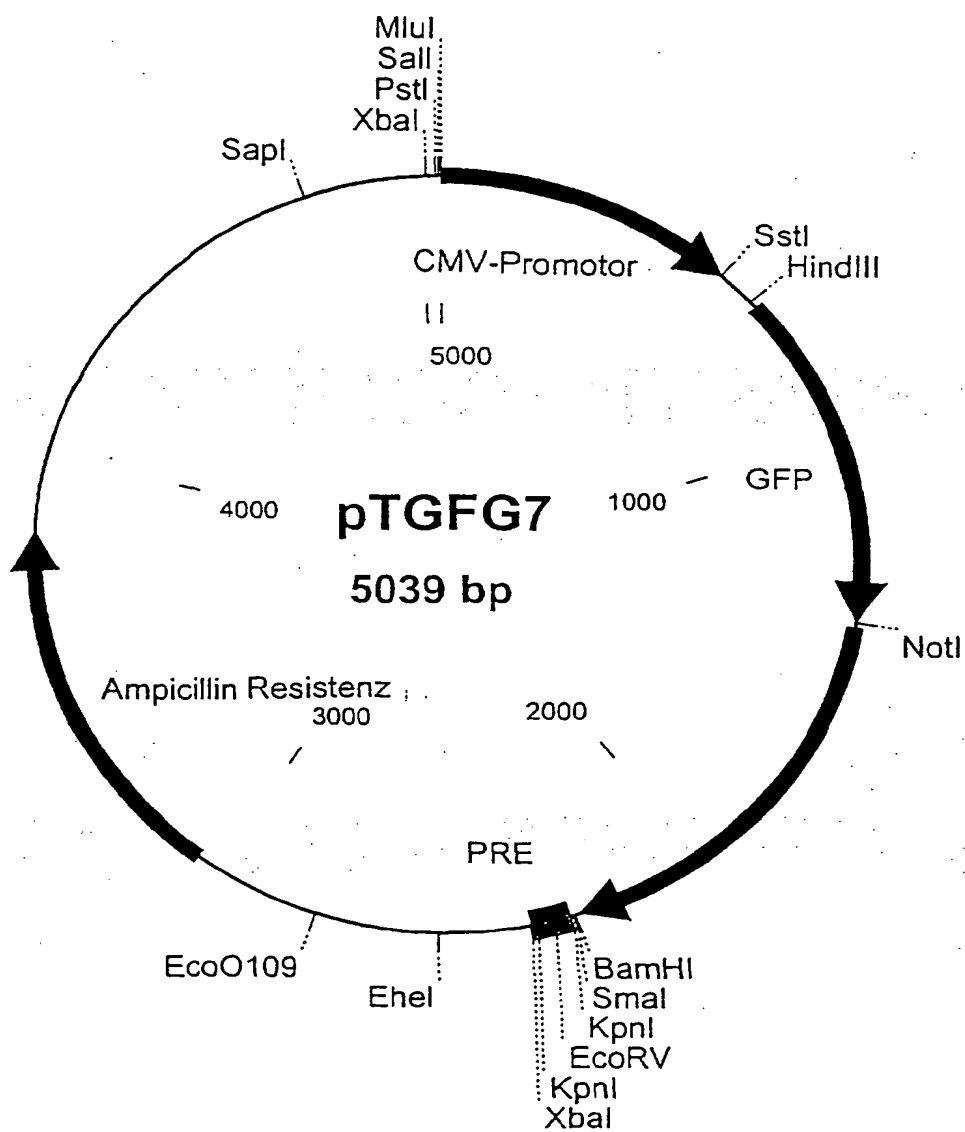


Abbildung 6

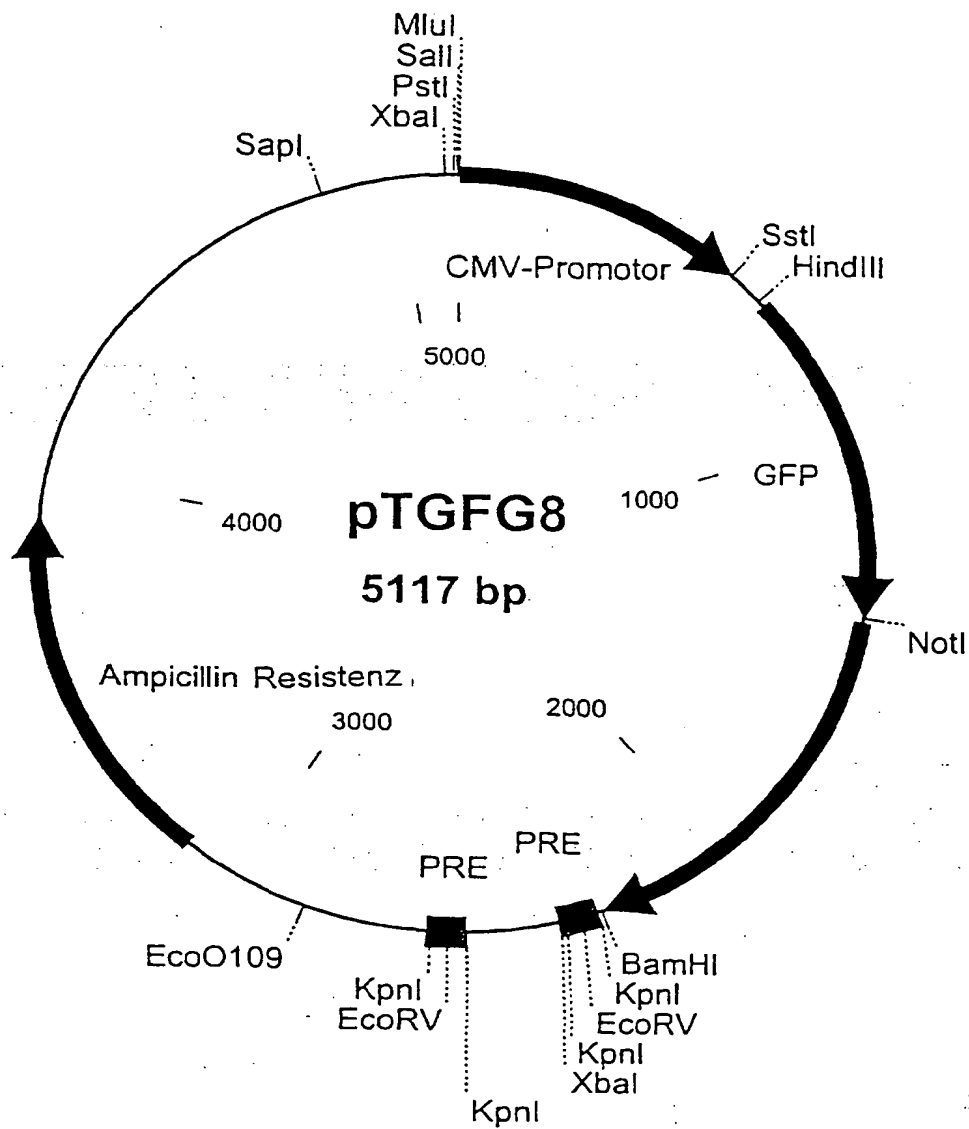


Abbildung 7

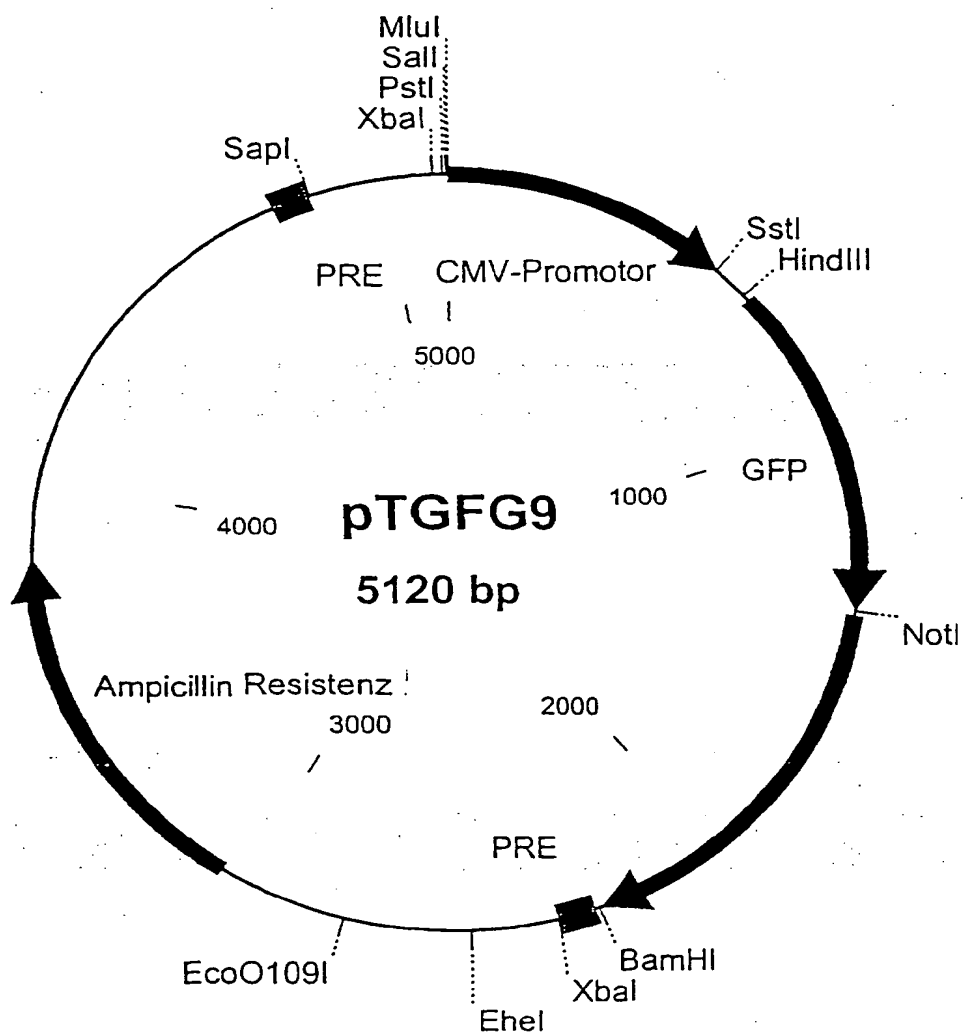


Abbildung 8

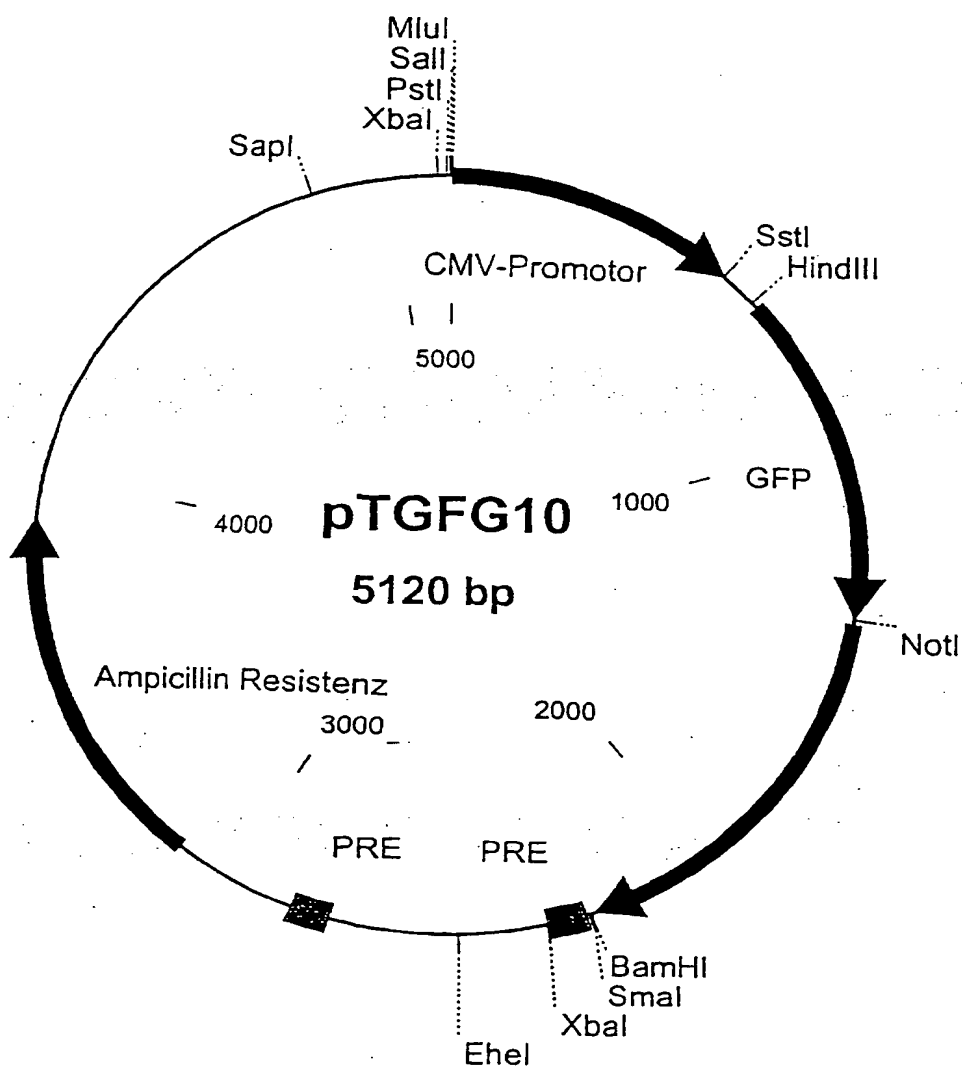


Abbildung 9

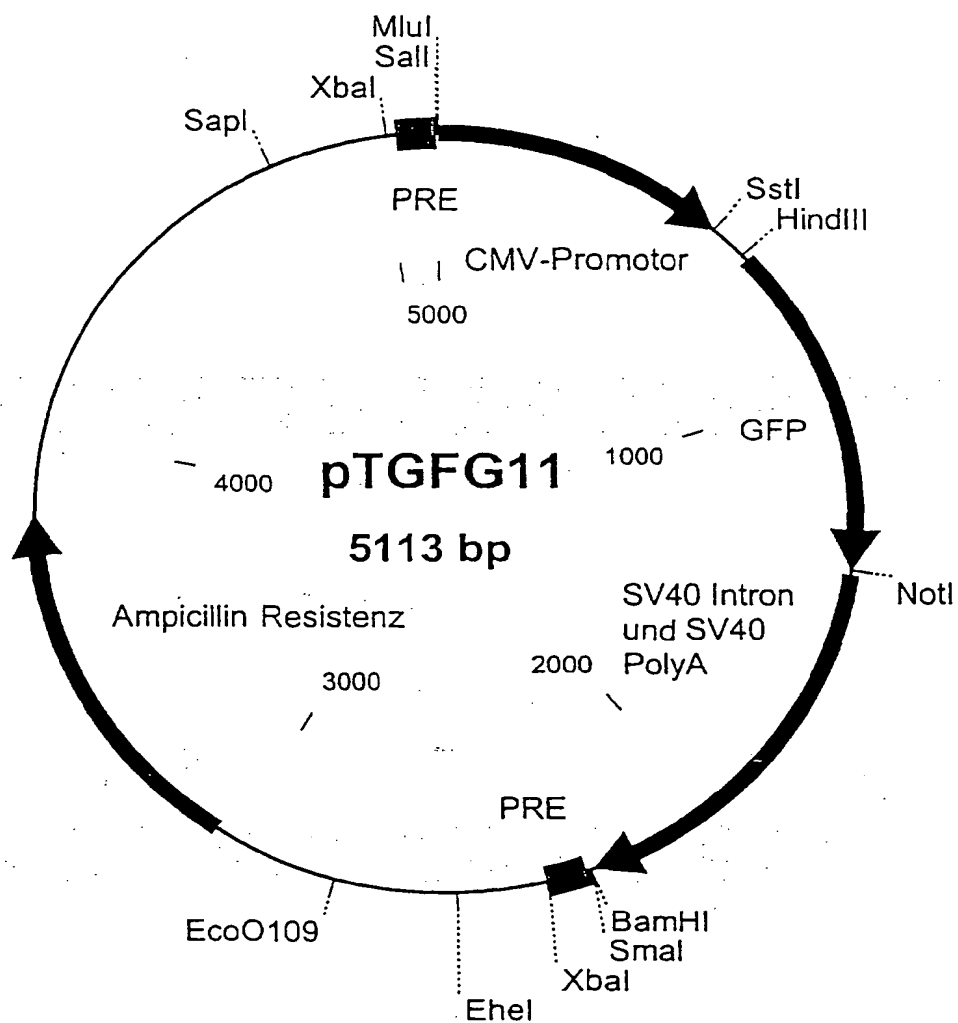


Abbildung 10

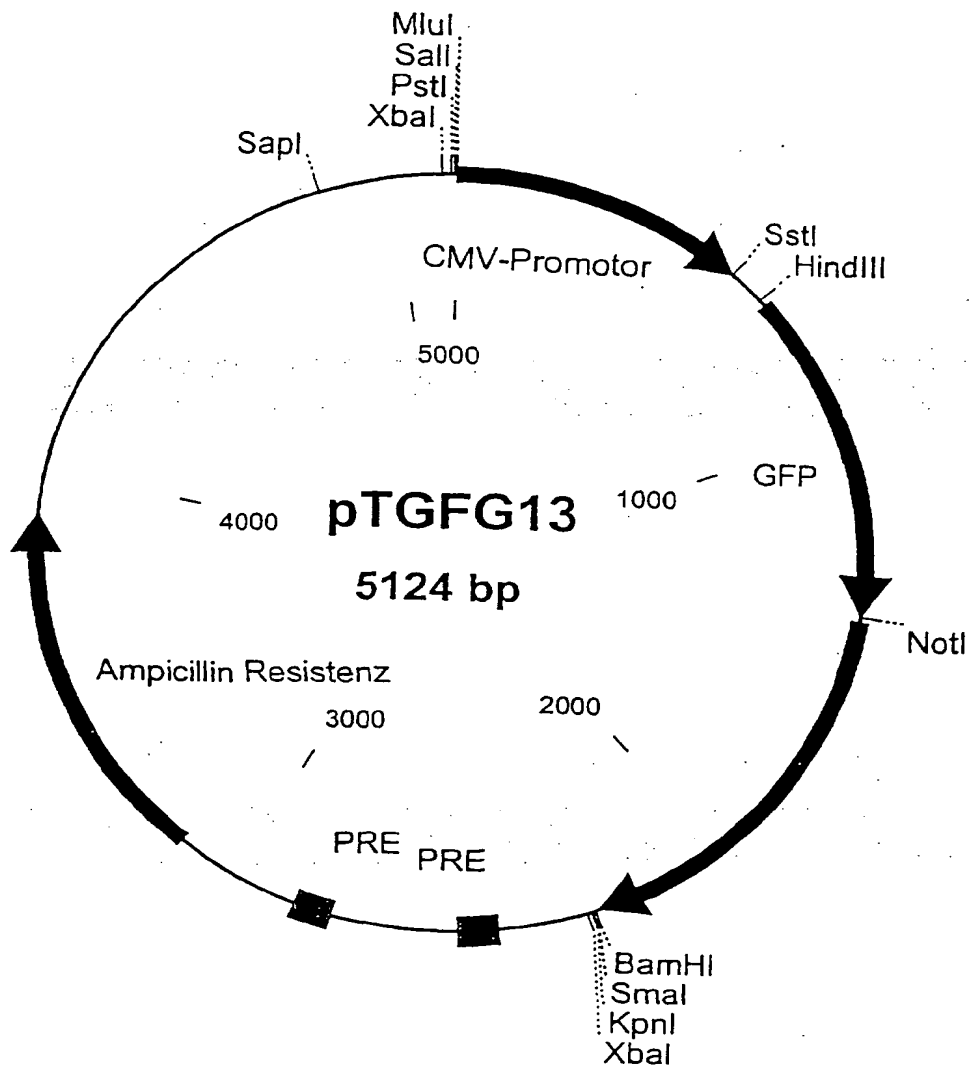


Abbildung 11

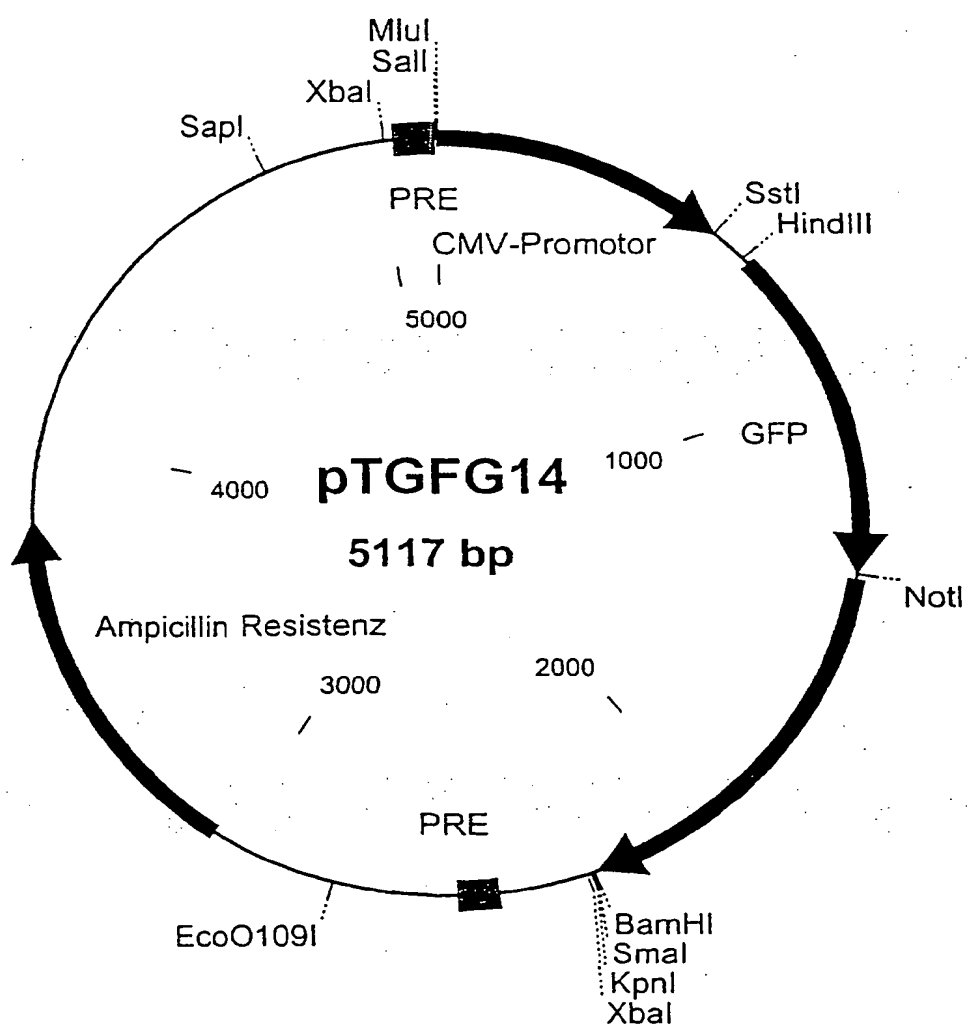


Abbildung 12

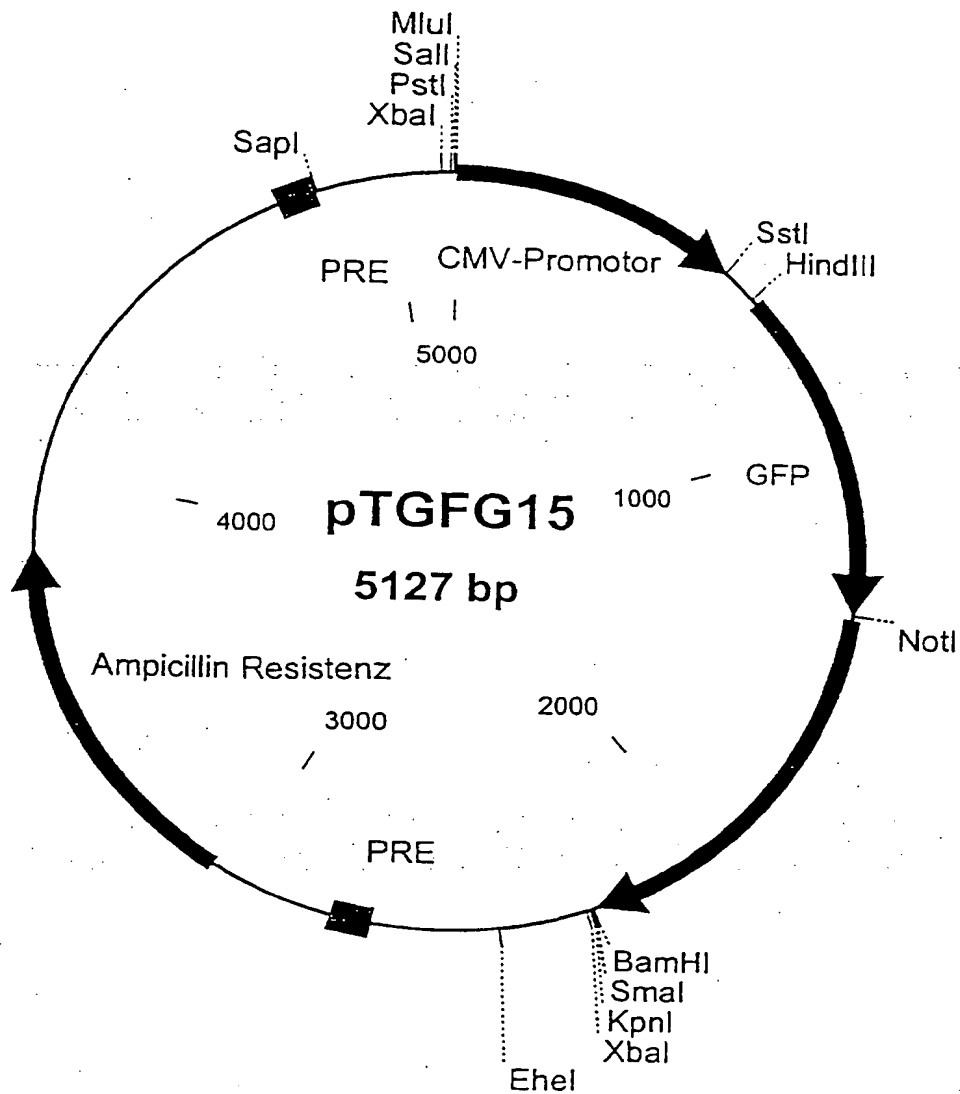


Abbildung 13

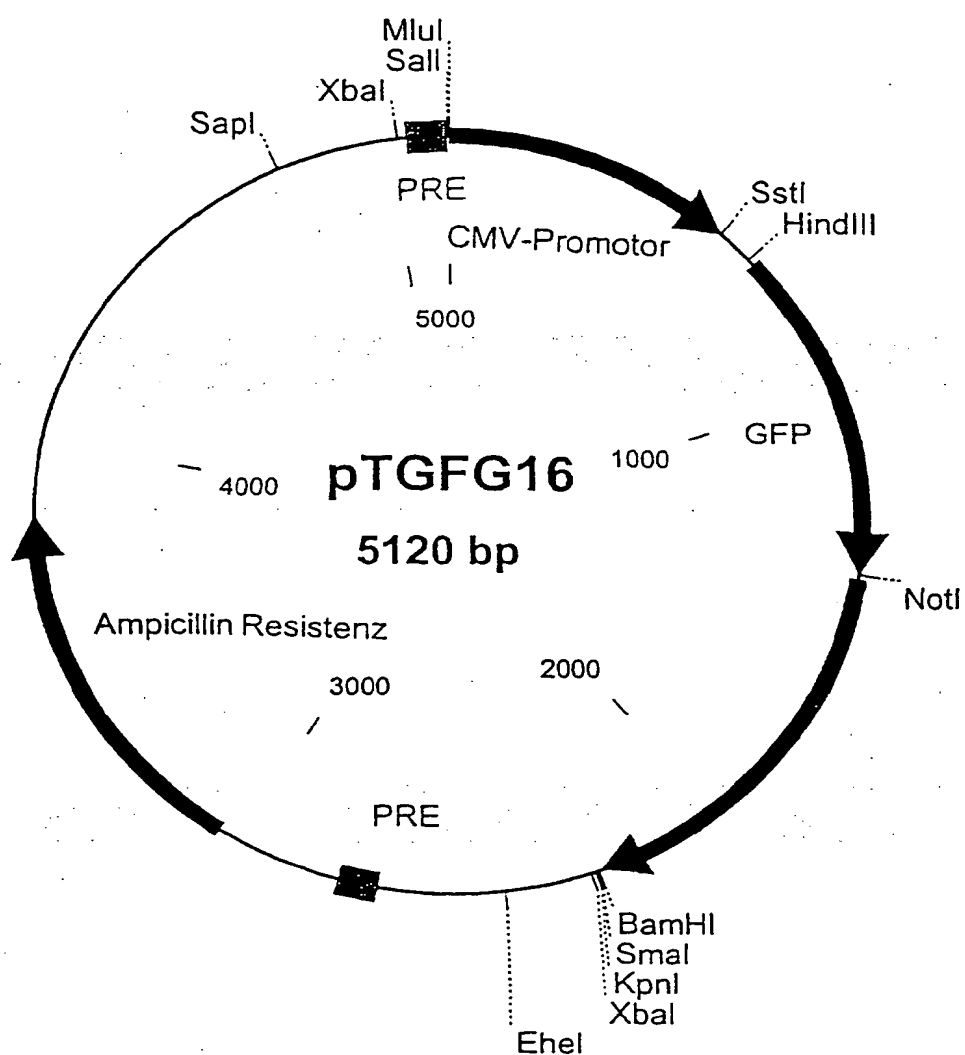


Abbildung 14

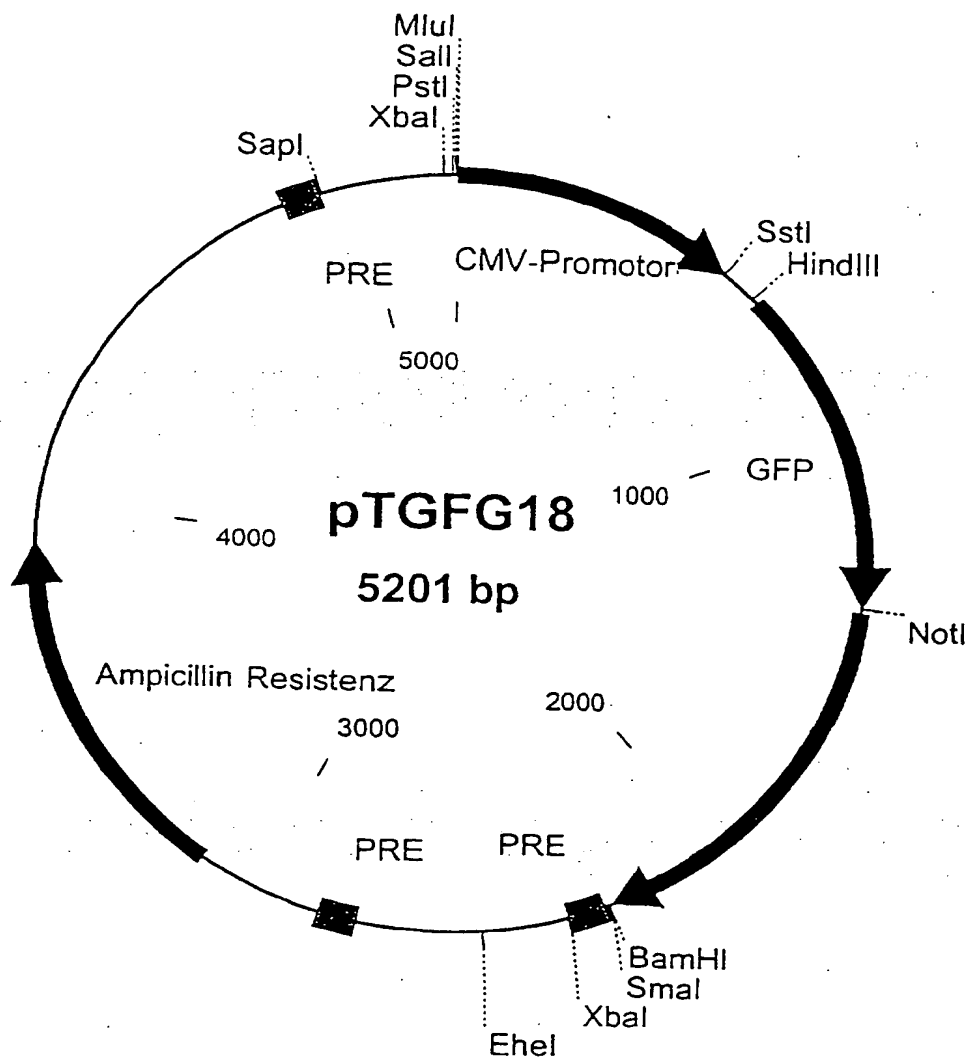


Abbildung 15

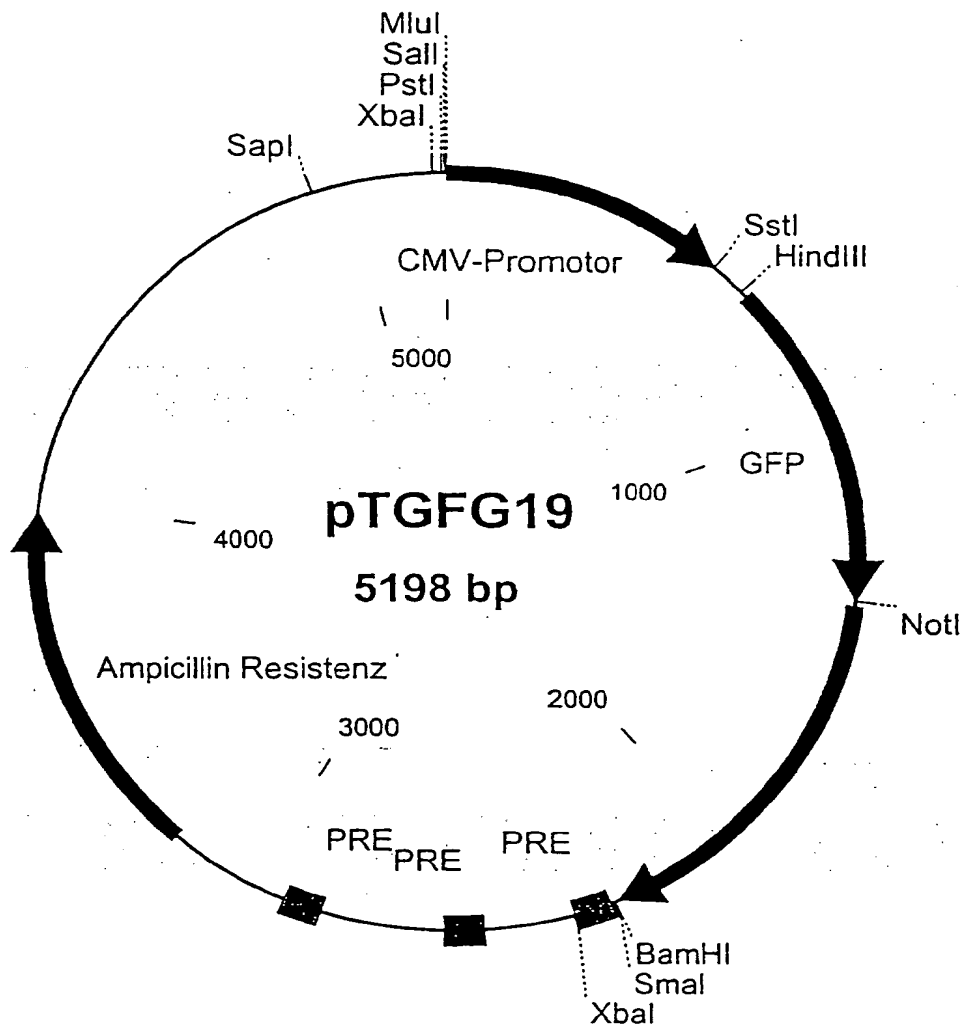


Abbildung 16

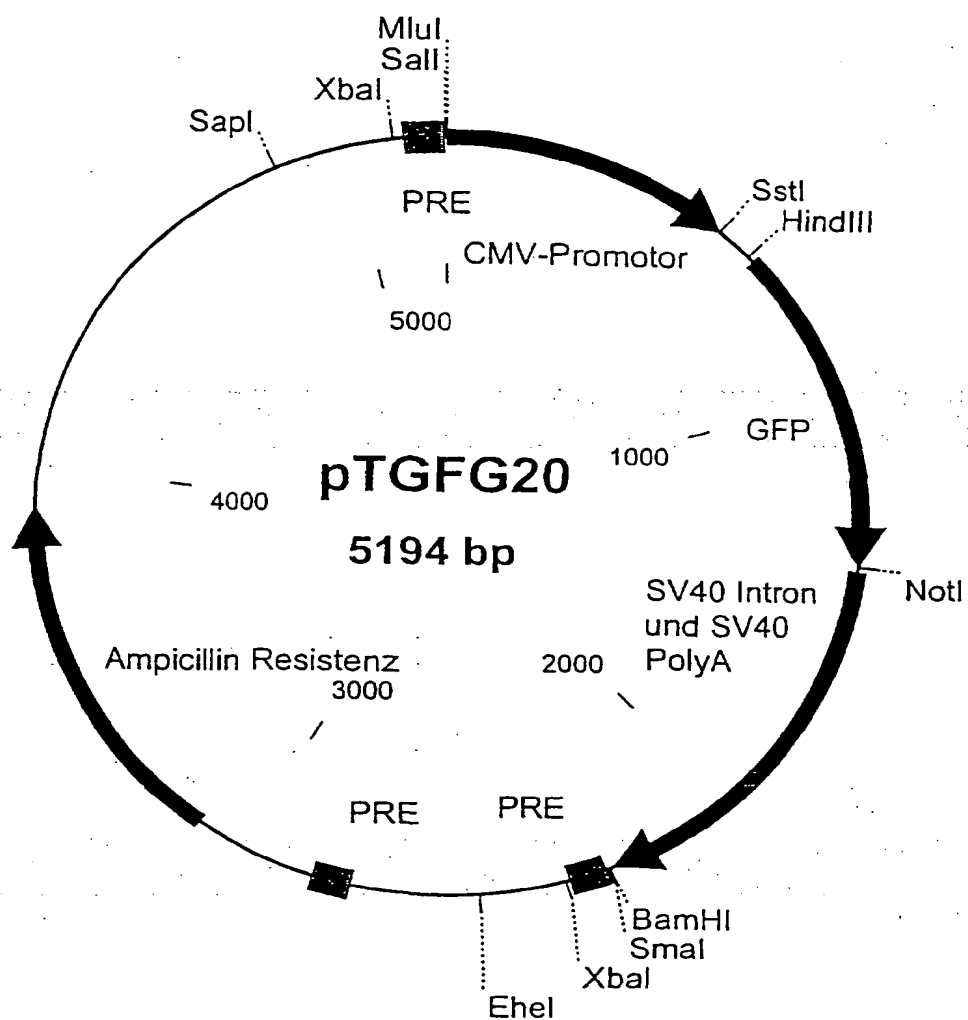


Abbildung 17

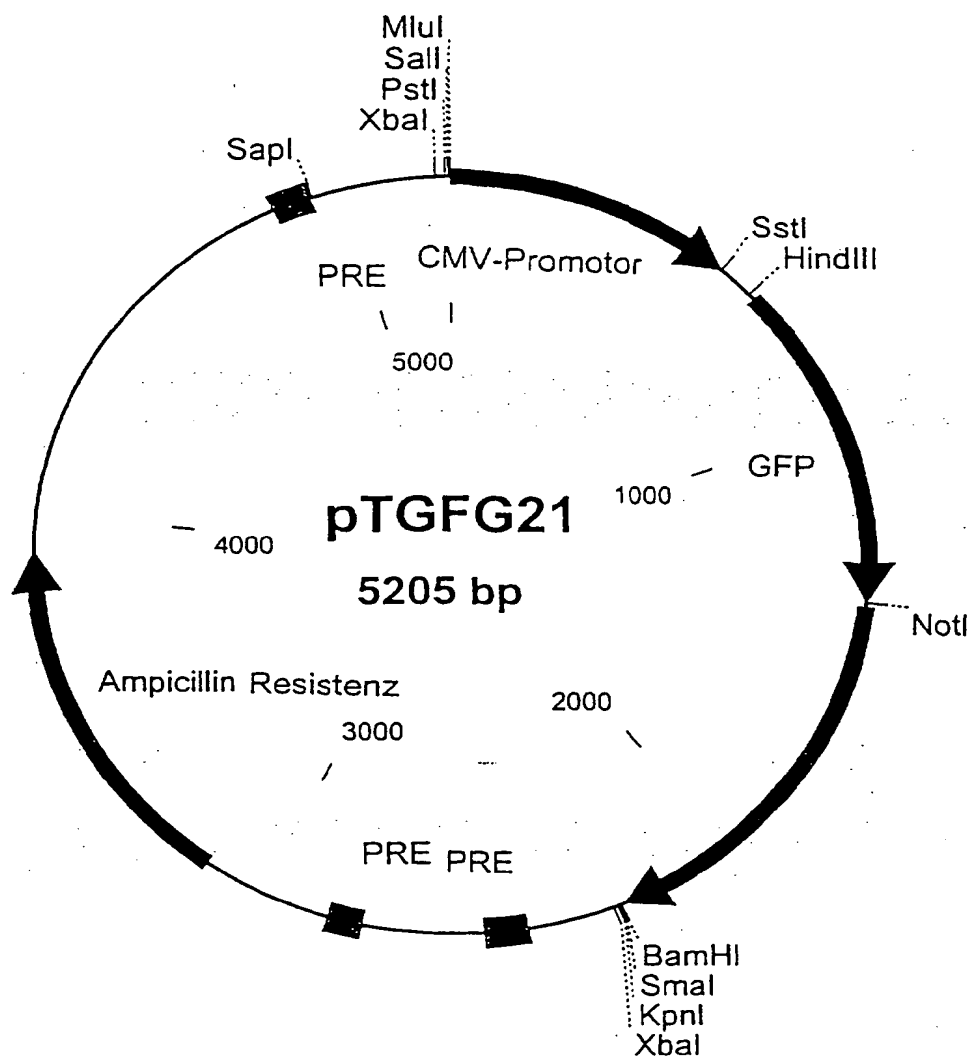


Abbildung 18

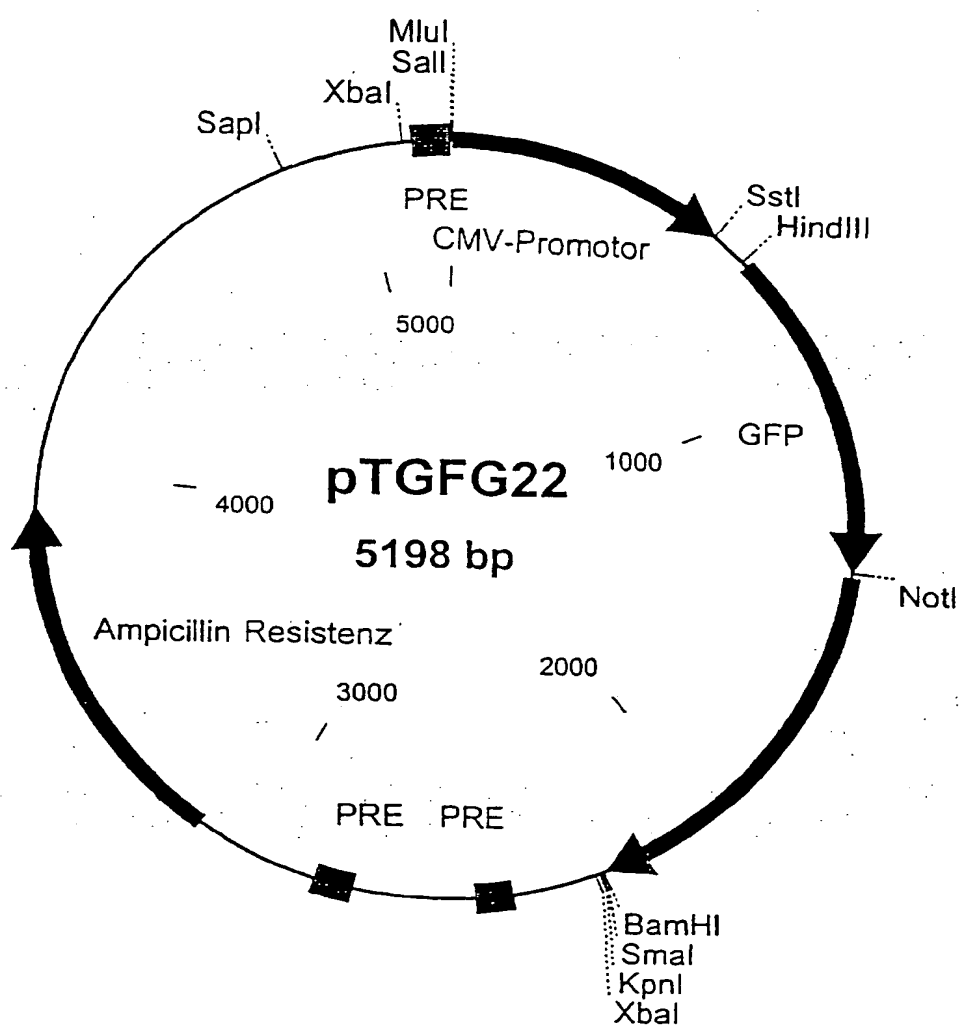


Abbildung 19

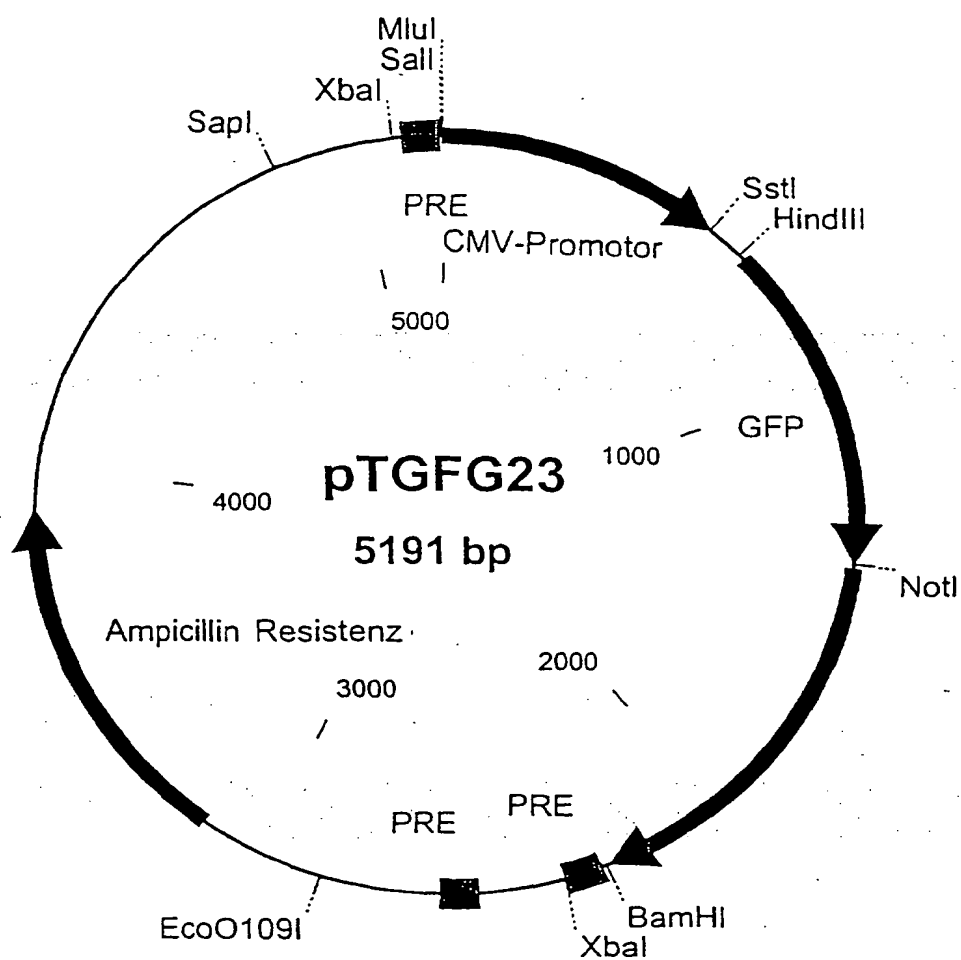


Abbildung 20

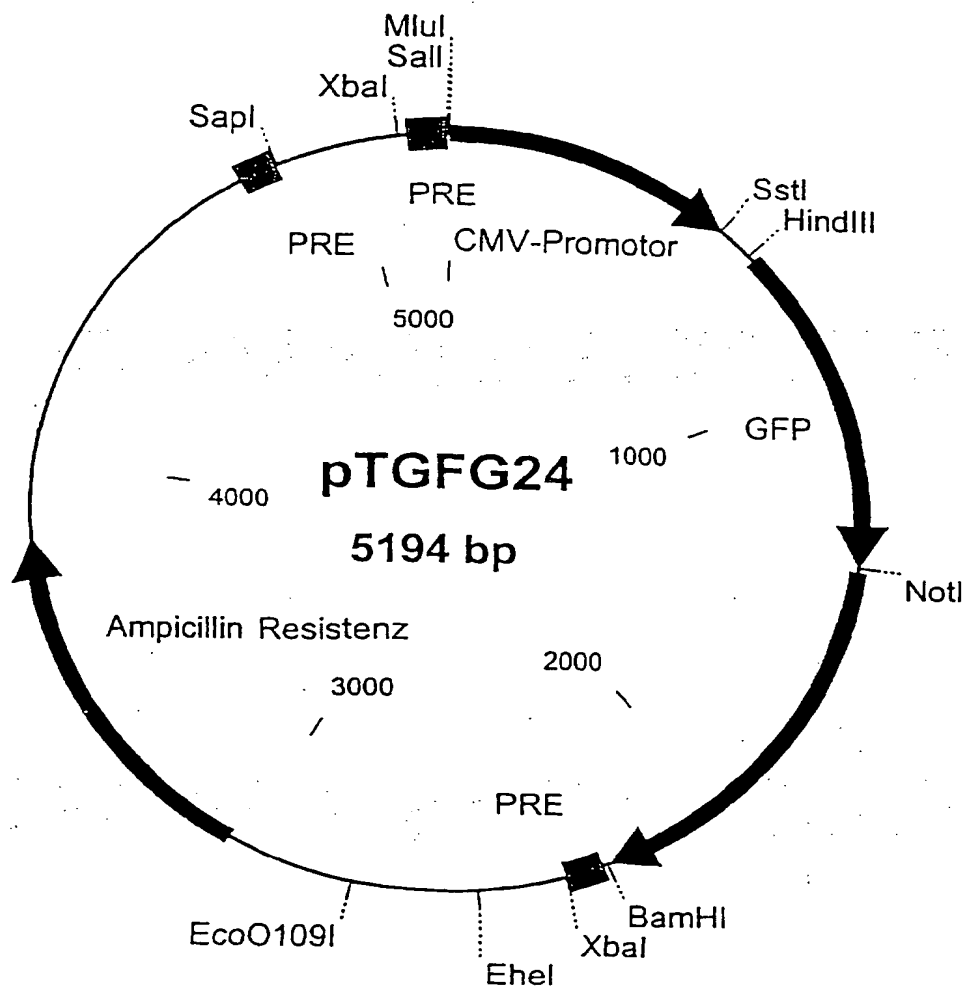


Abbildung 21

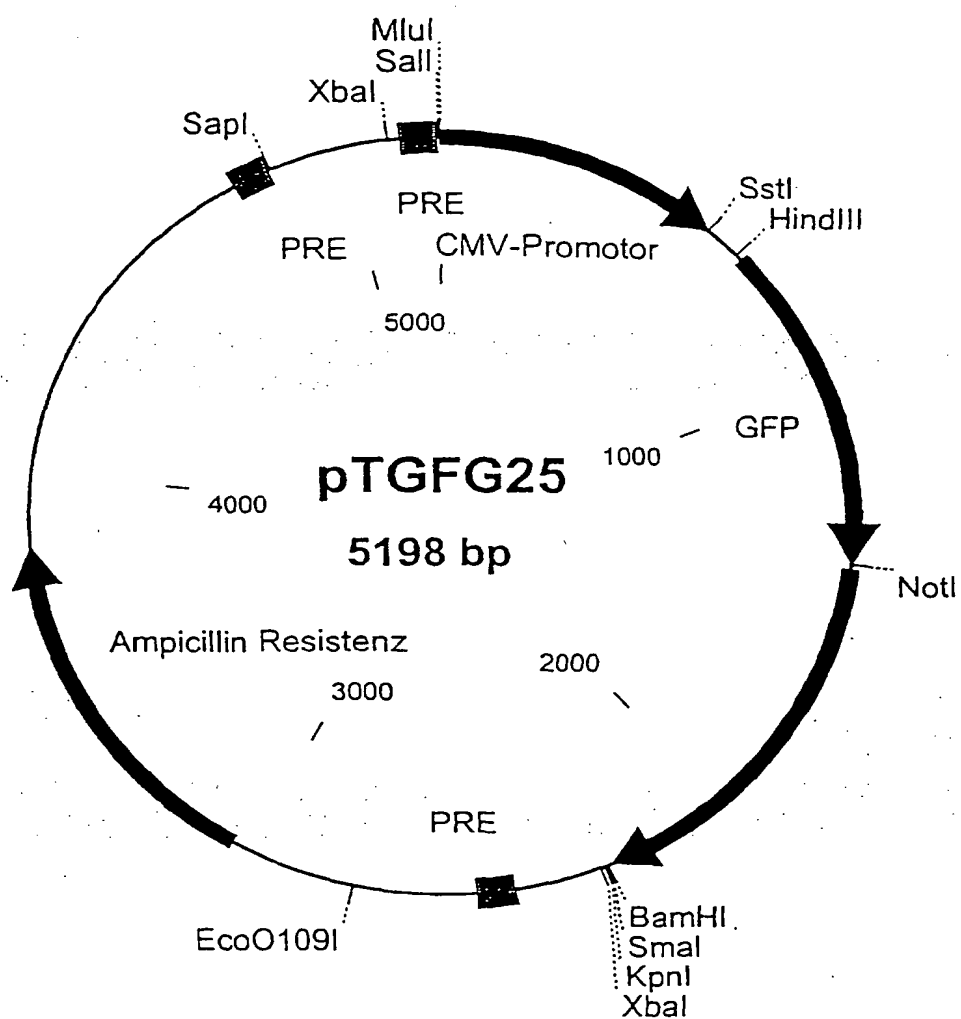


Abbildung 22

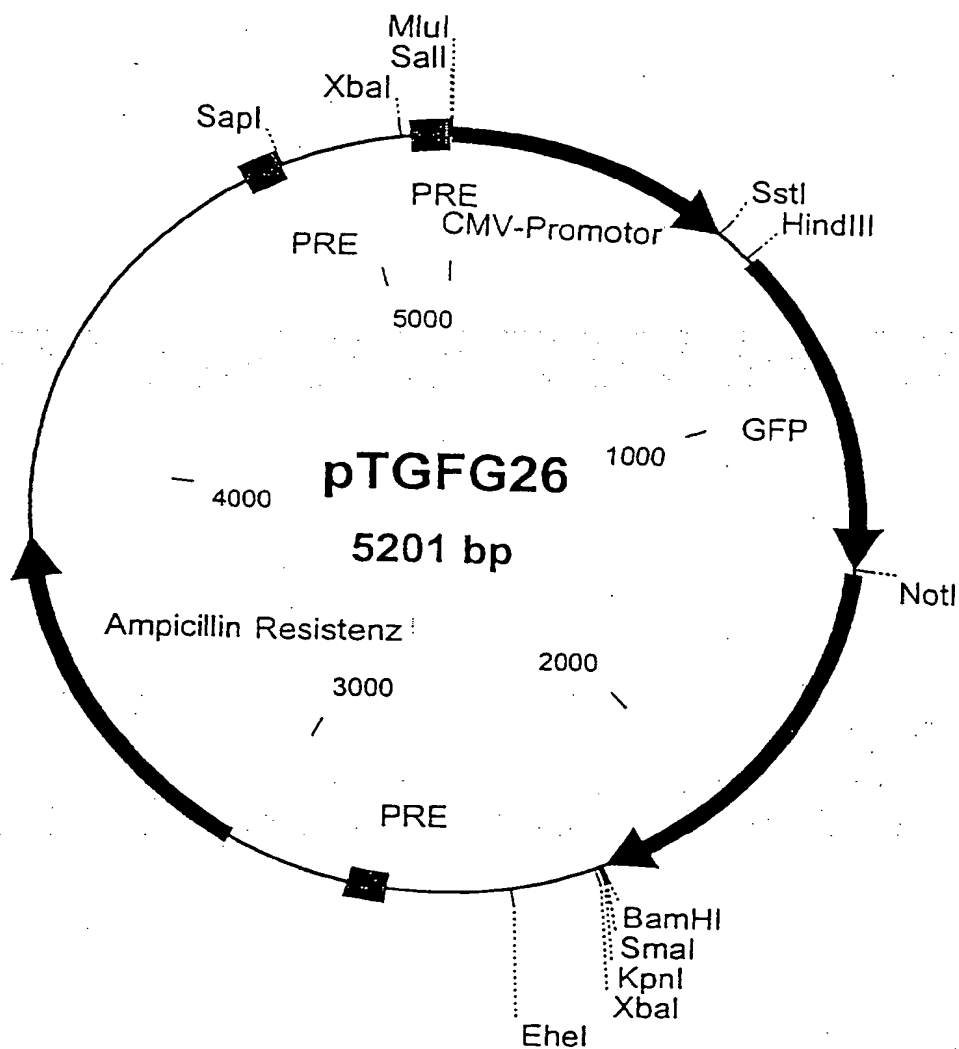


Abbildung 23

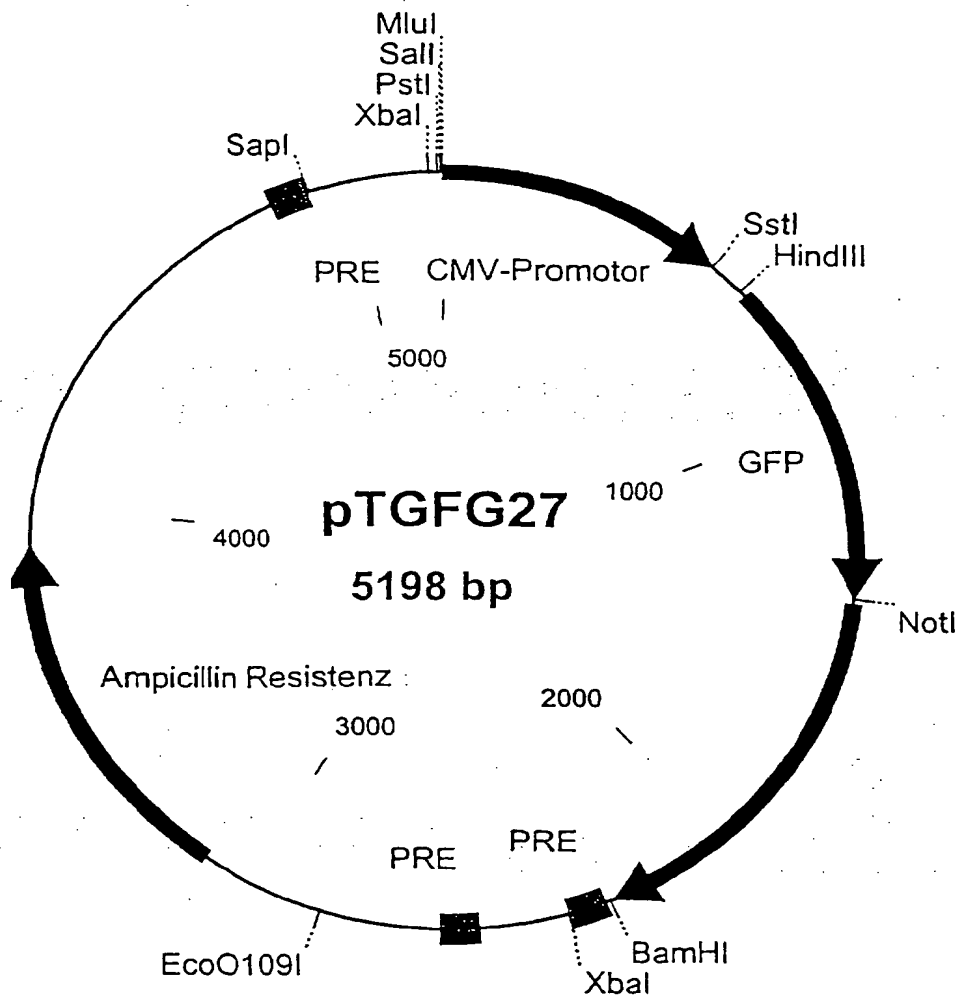


Abbildung 24

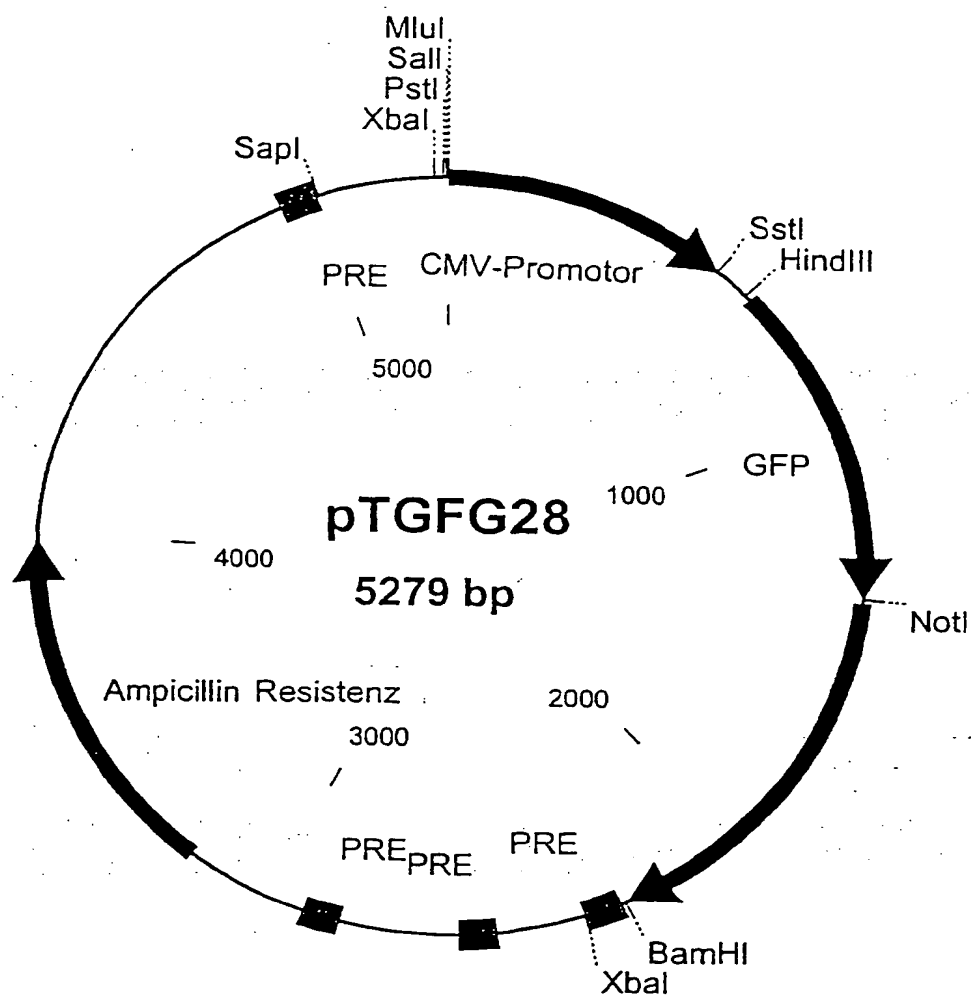


Abbildung 25

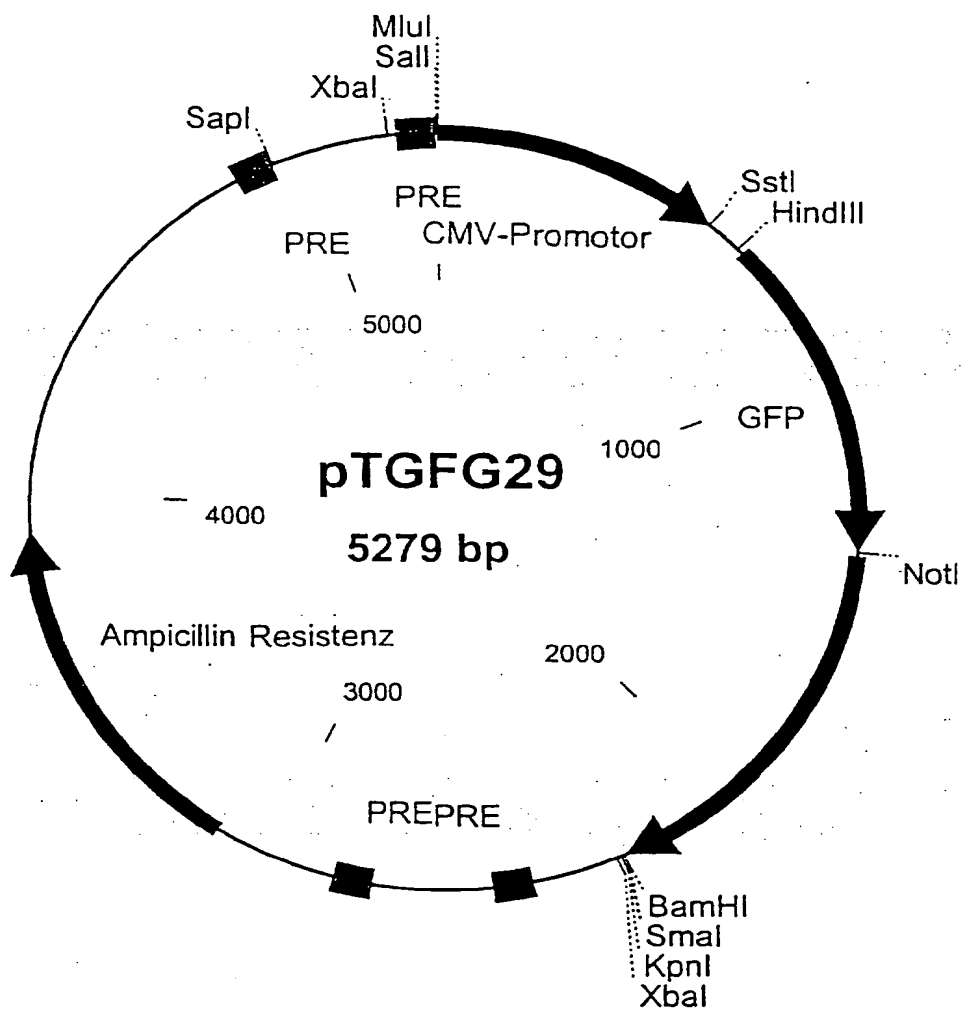


Abbildung 26

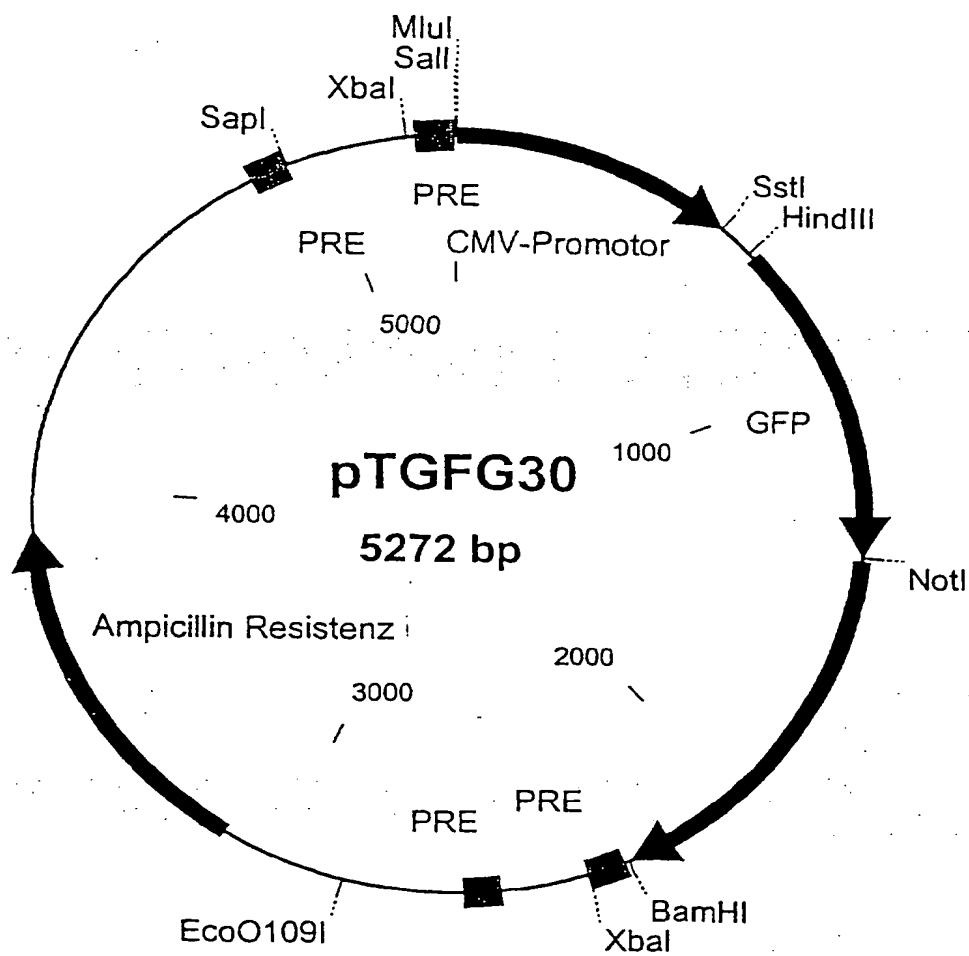


Abbildung 27

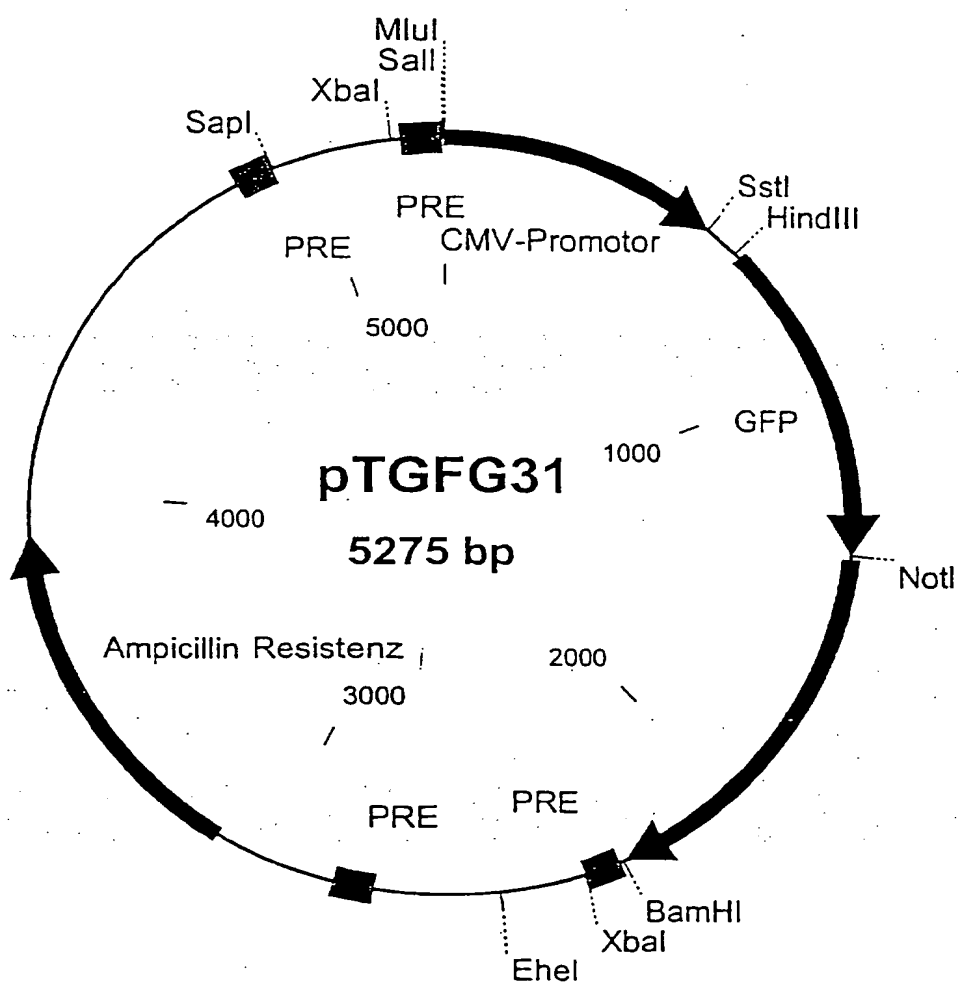


Abbildung 28

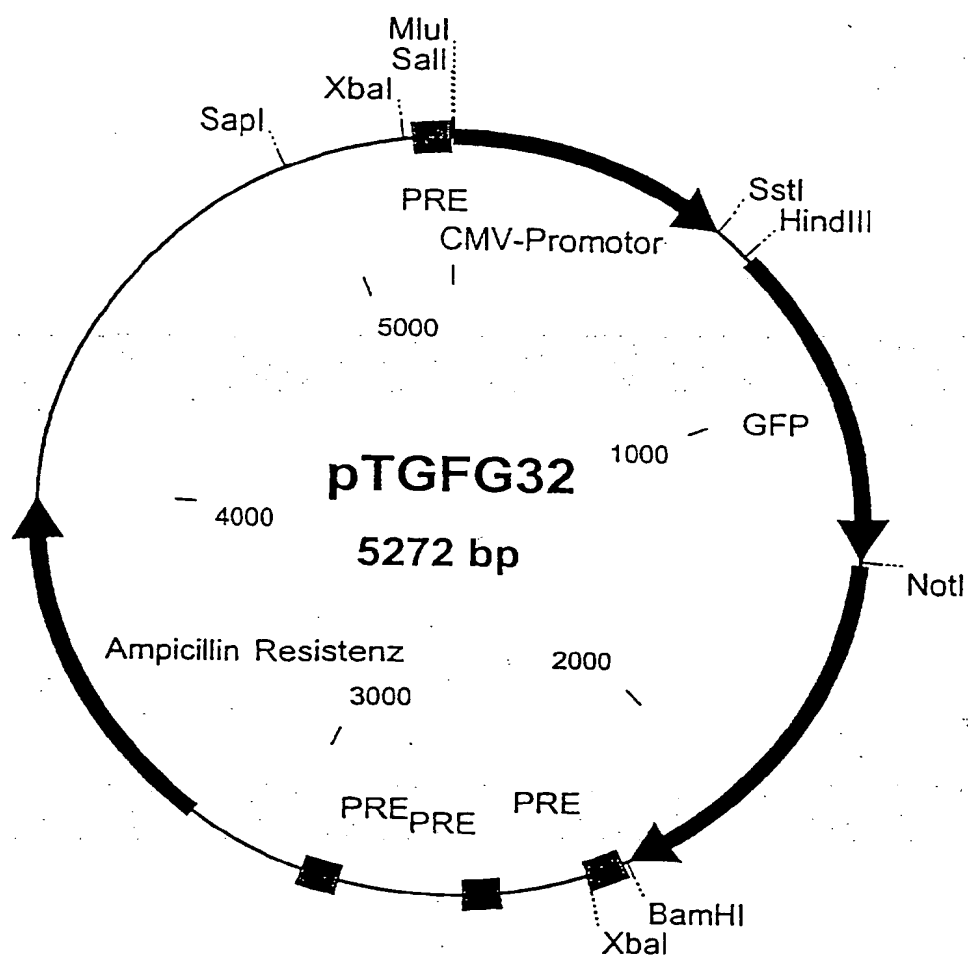


Abbildung 29

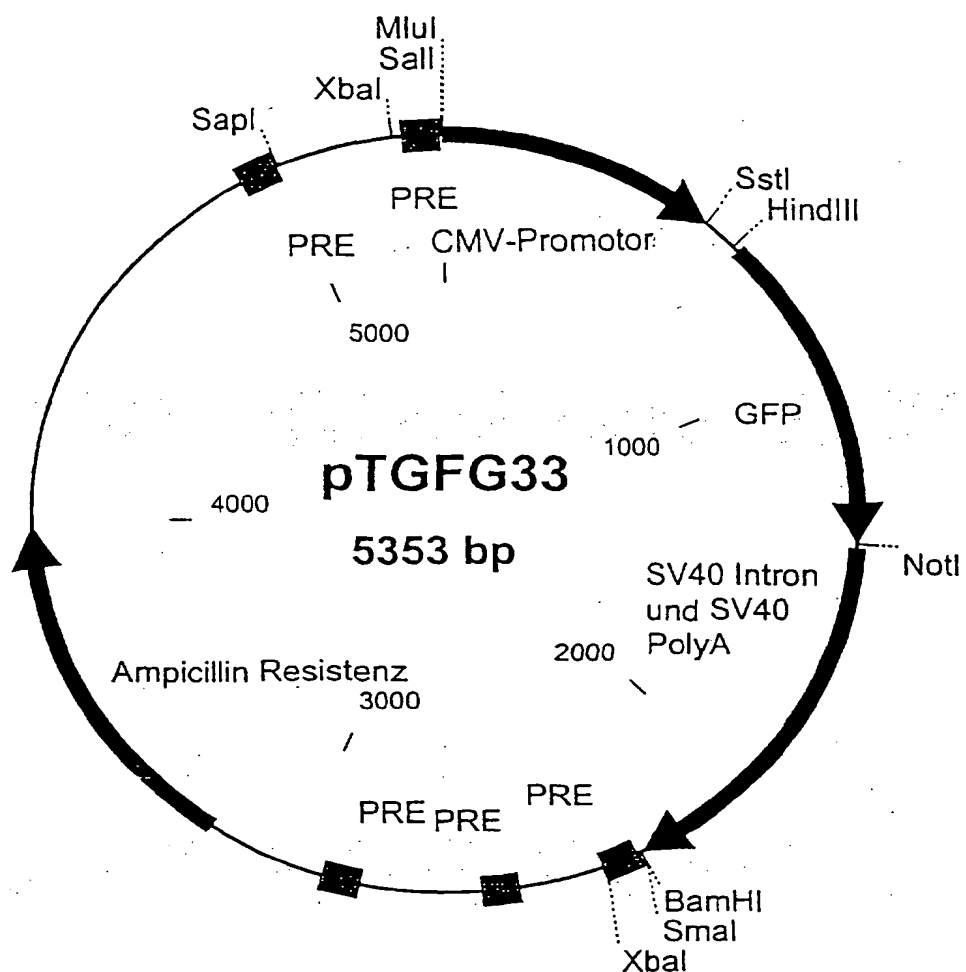


Abbildung 30

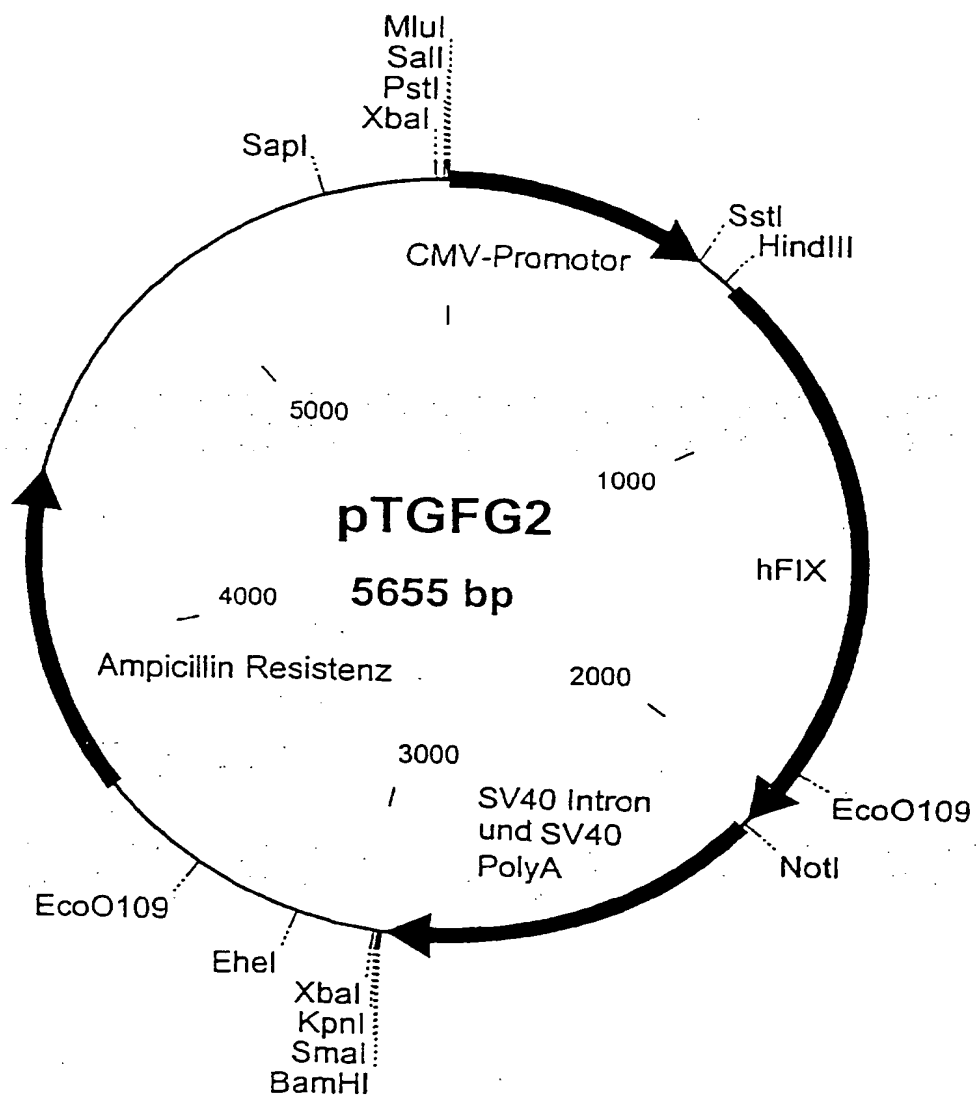


Abbildung 31

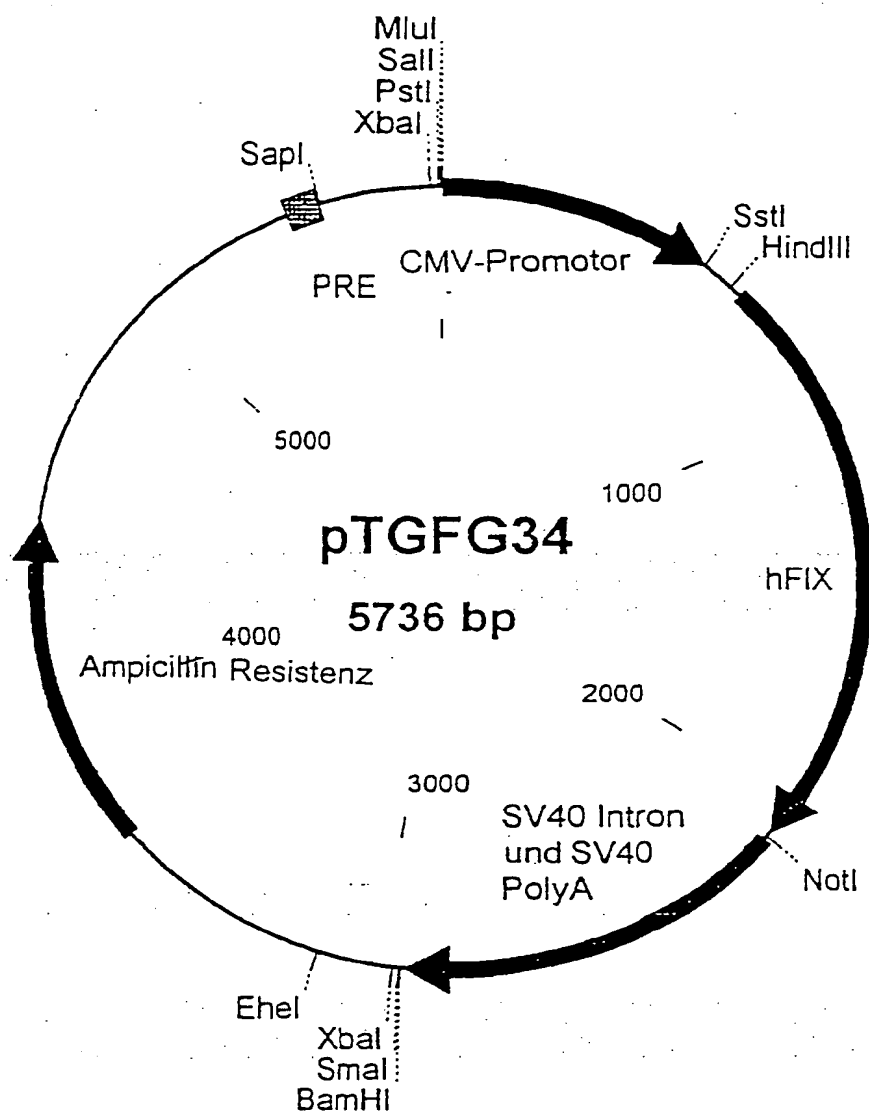


Abbildung 32

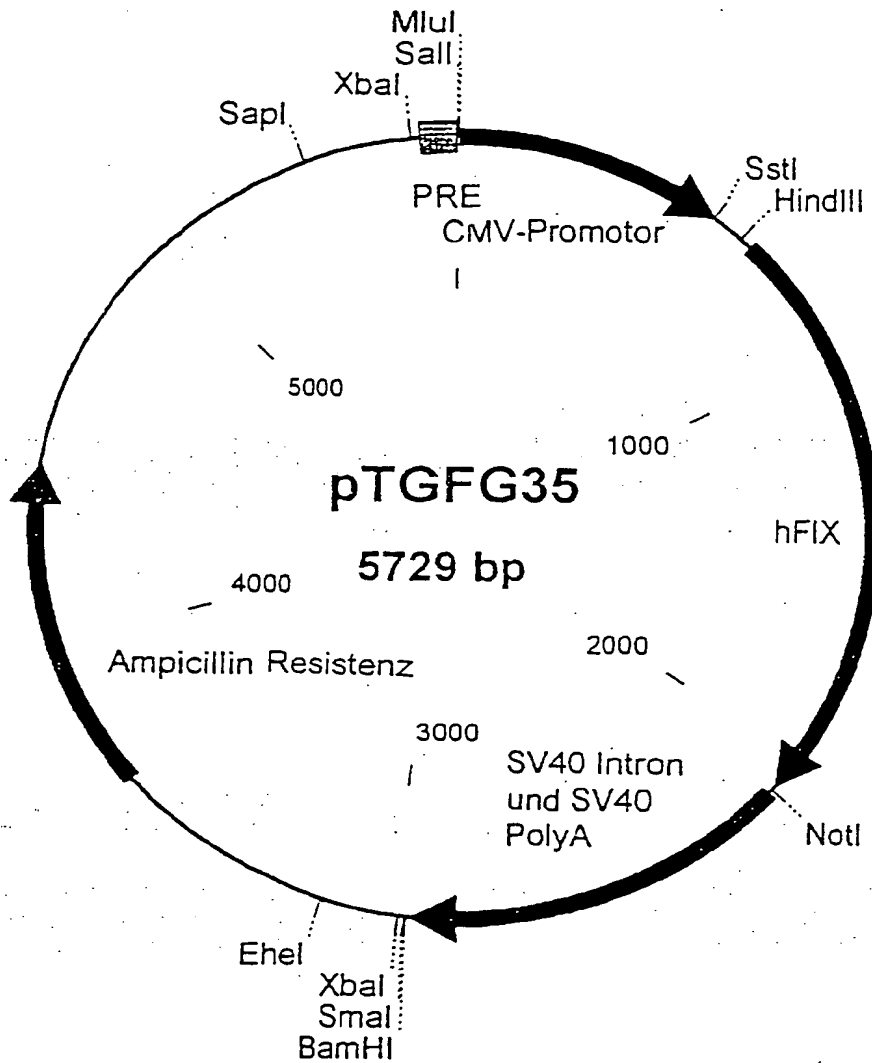


Abbildung 33

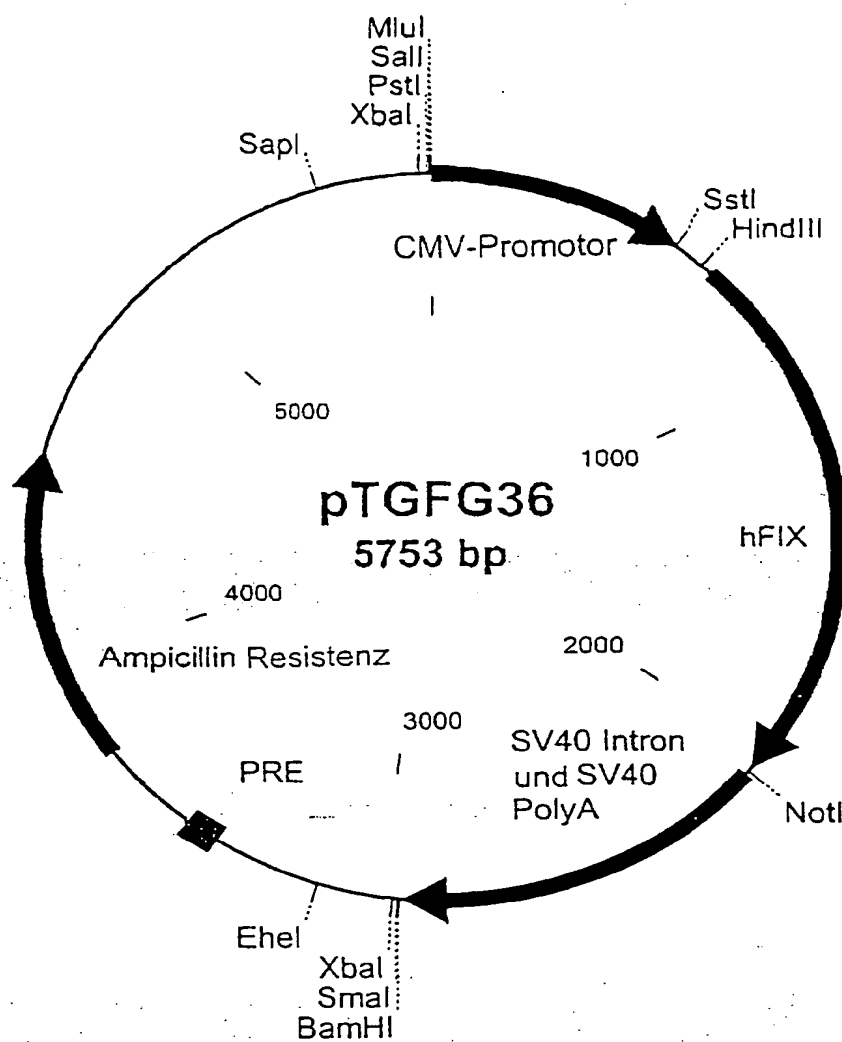


Abbildung 34

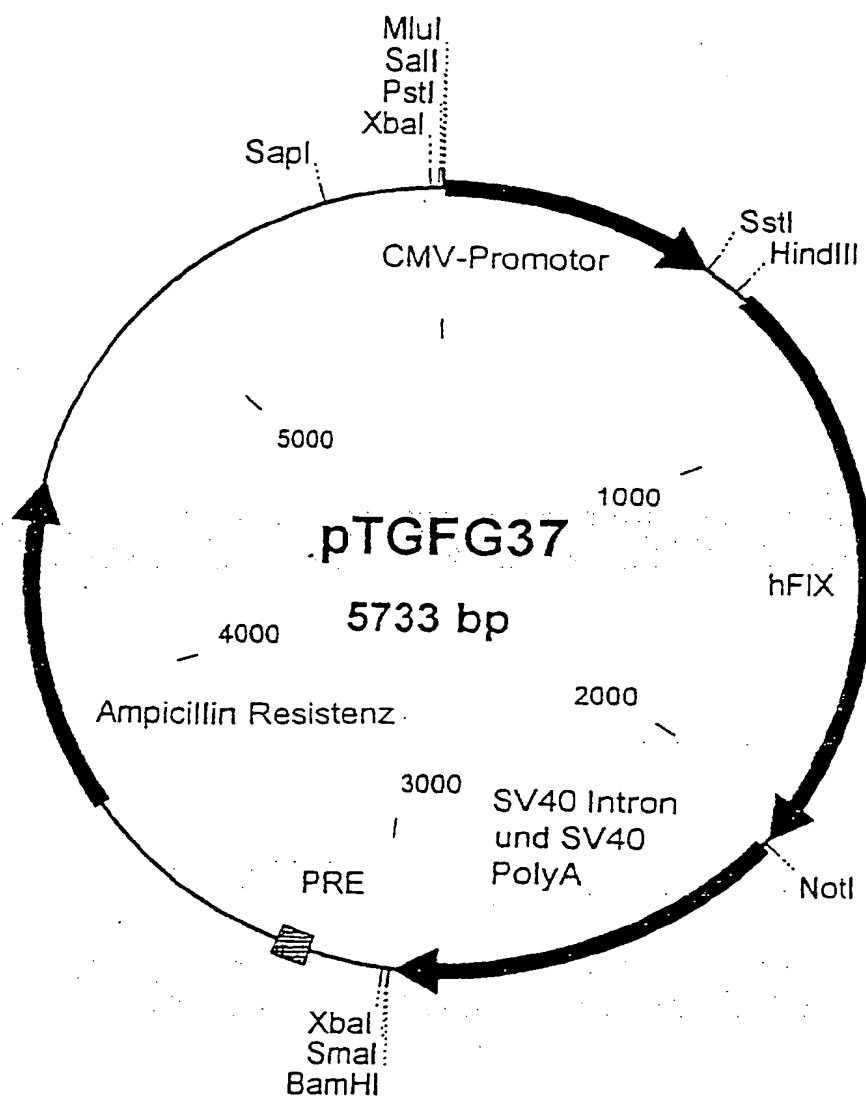


Abbildung 35

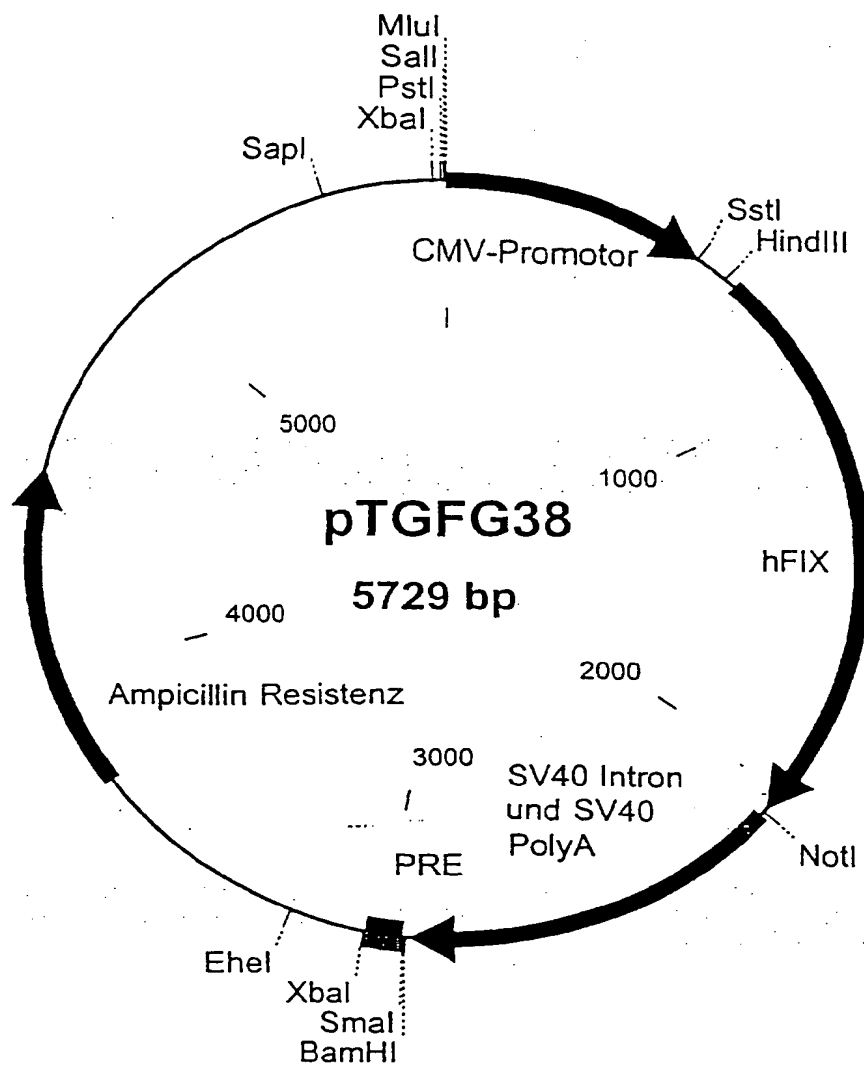


Abbildung 36

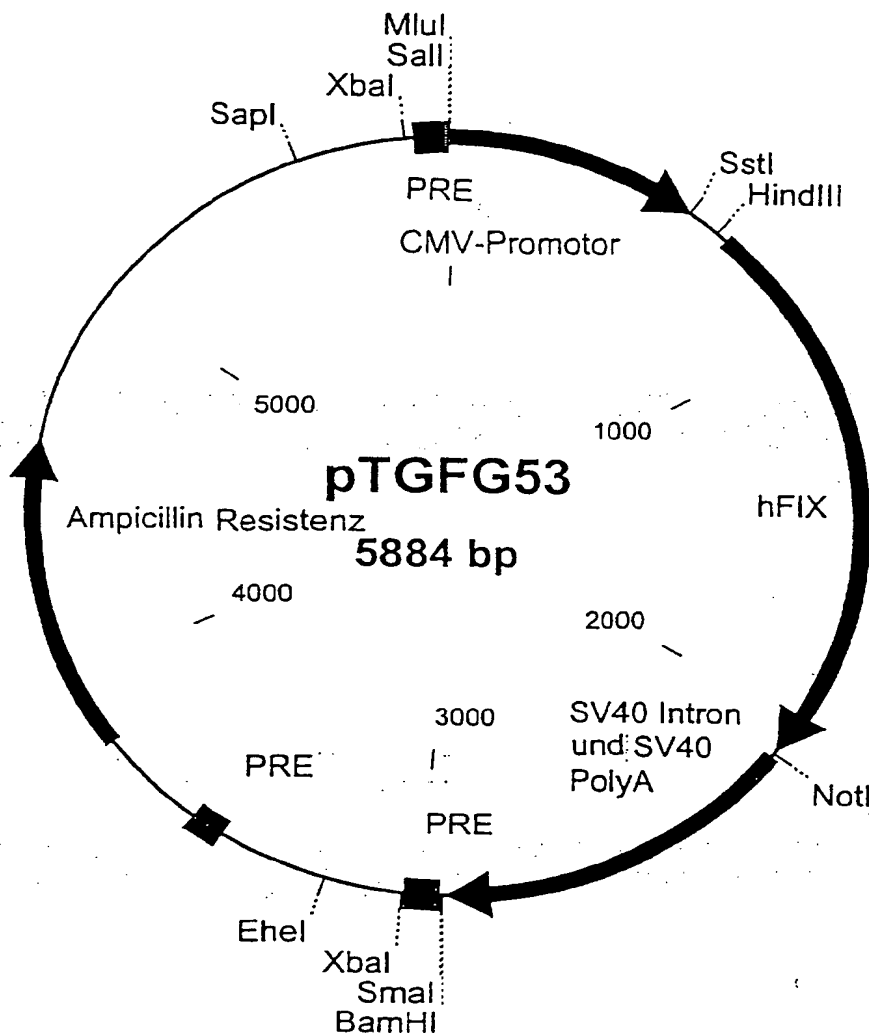


Abbildung 37

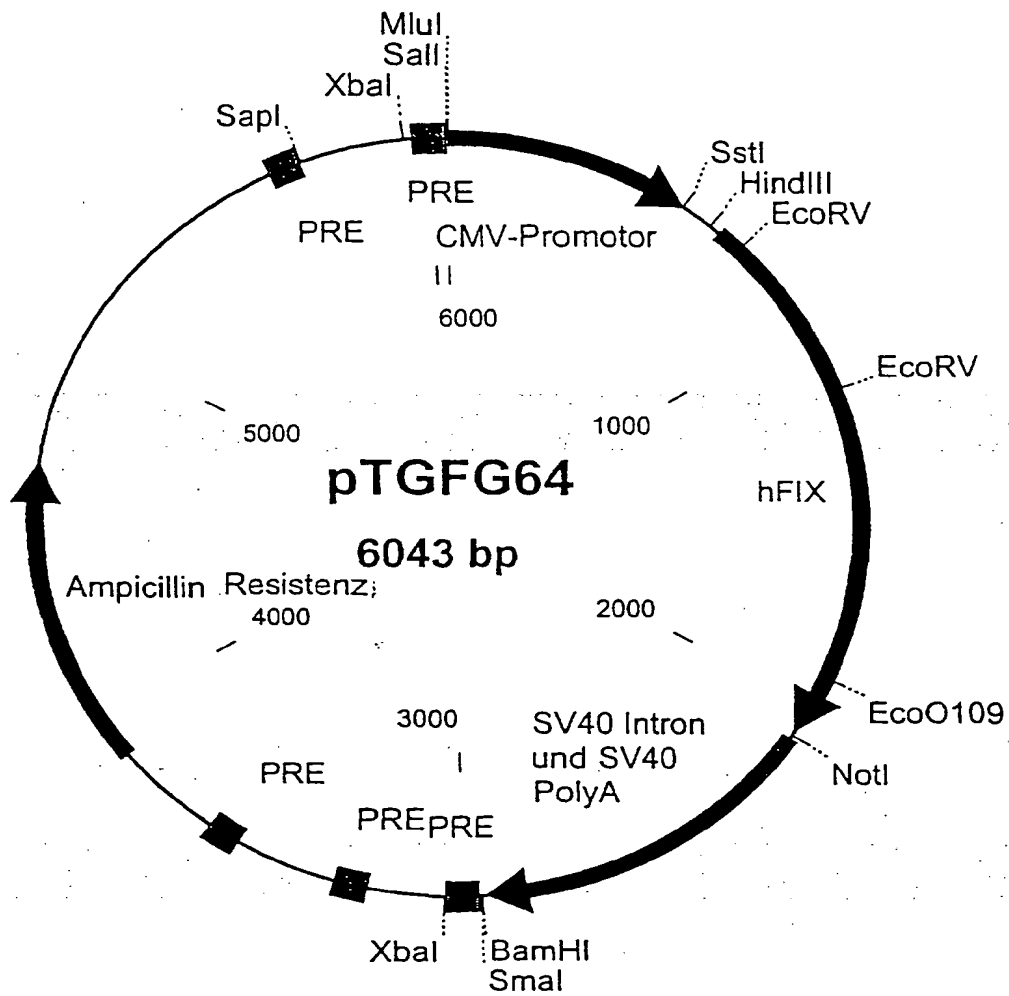


Abbildung 38

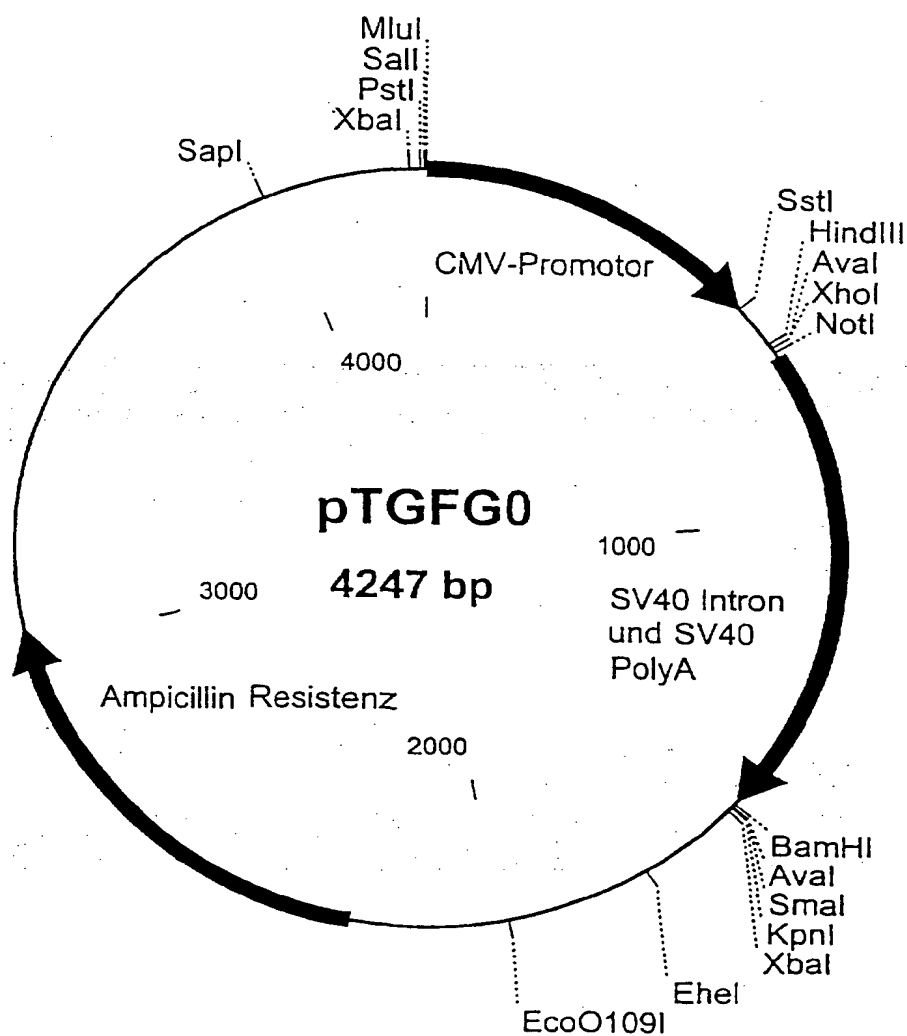


Abbildung 39

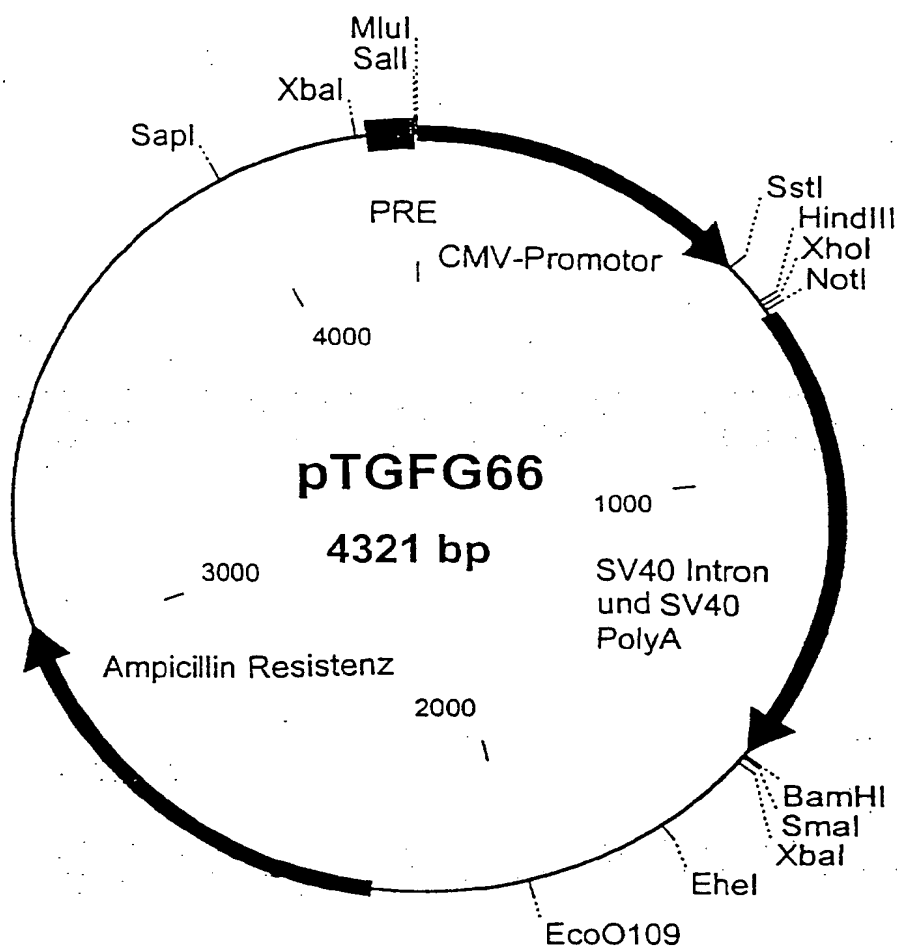


Abbildung 40

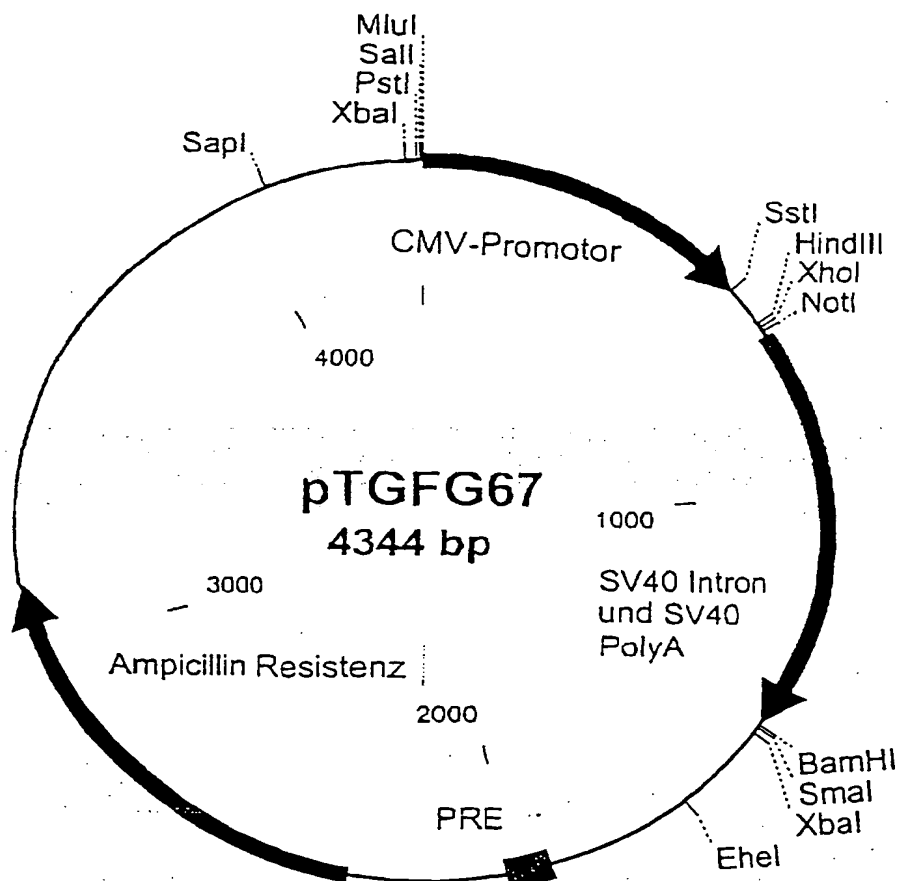


Abbildung 41

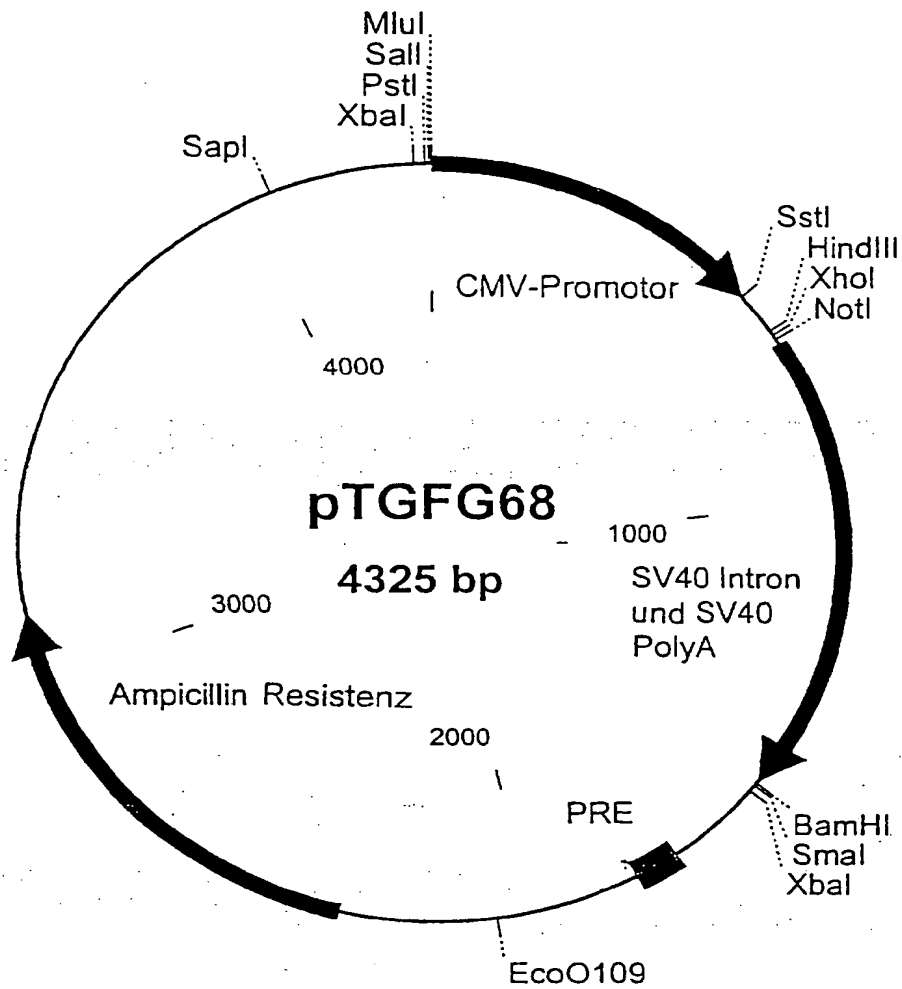


Abbildung 42

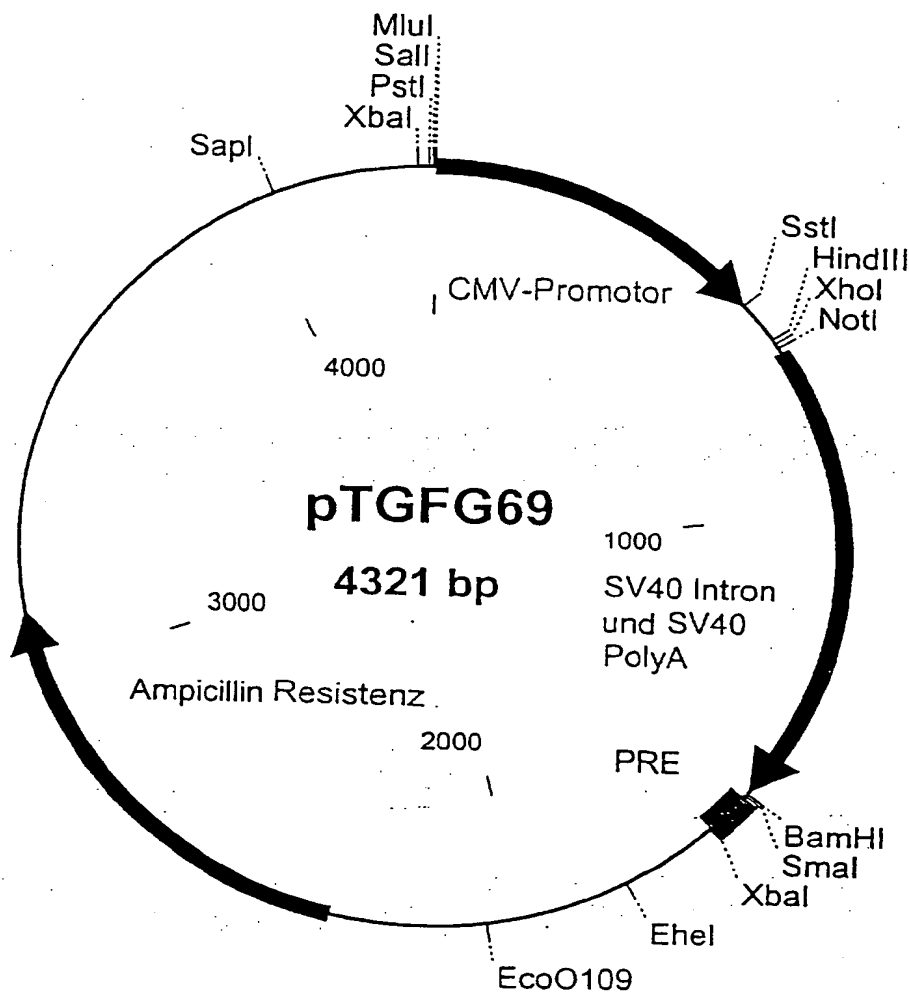


Abbildung 43

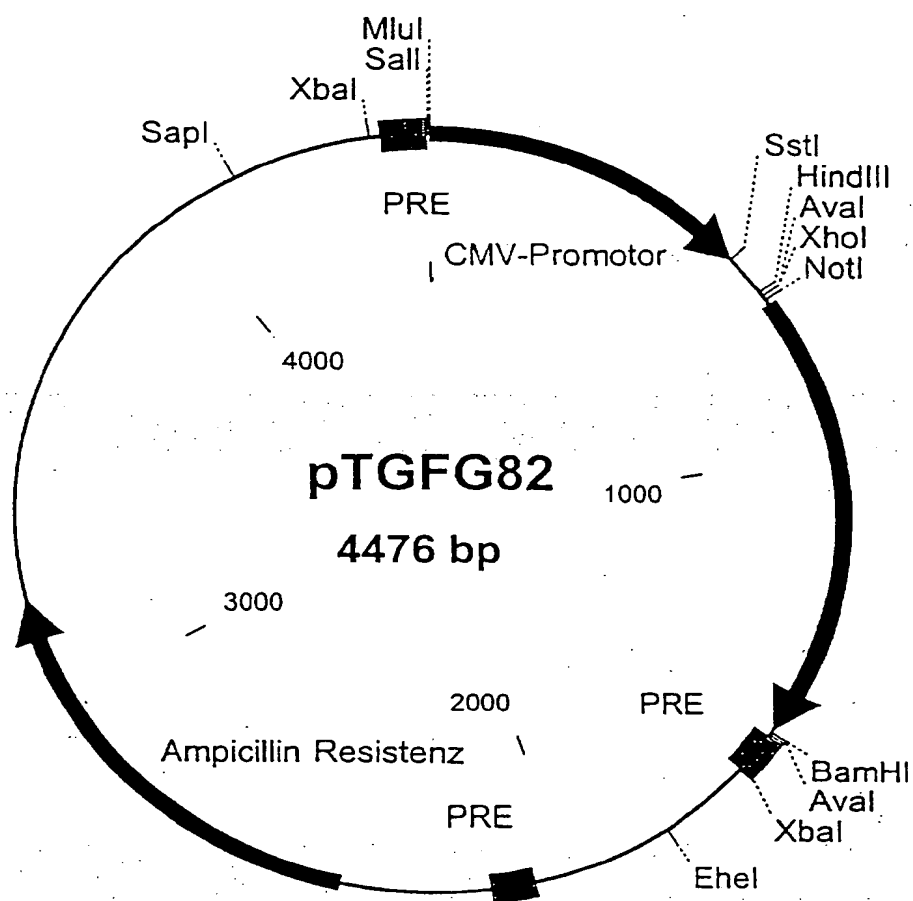
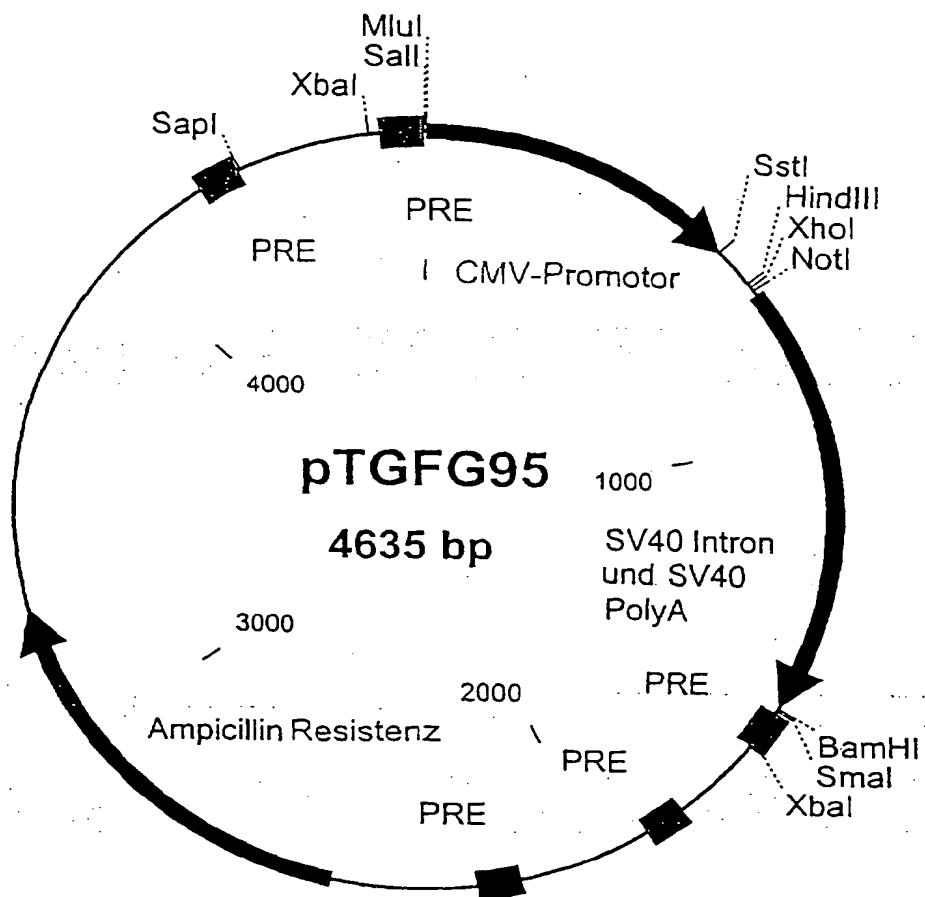


Abbildung 44



Sequenz pTGFG36 13.1.1993 20:18 Uhr

Abbildung 45

| | | | | | |
|---------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 seq pTGFG36 | CGCGTTGACA | TTGATTATTC | ACTAGTTTAT | ATTAGTAATC | AATTACCGGG |
| 1 seq pTGFG36 | TCATTAGTTC | ATAGCCCATC | TATGGAGTTC | CGCGTTACAT | AATTACCGGT |
| 1 seq pTGFG36 | AAATGGCCCC | CCTGGCTGAC | CGCCCAACGA | CCCCCCCCCA | TTGACGTCAA |
| 1 seq pTGFG36 | TRATGACGTA | TGTTCCCATC | GTAACGCCAA | TAGGGACTTT | CCATTGACGT |
| 1 seq pTGFG36 | CAATGGGTGG | AGTATTTACG | GTAAGTGGC | CACTTGGCAG | TACATCAAGT |
| 1 seq pTGFG36 | GTATCATATG | CCAAGTACGC | CCCCTATTGA | CGTCATGAC | GGTAATGGC |
| 1 seq pTGFG36 | CCGCCTGGCA | TTATGCCCAG | TACATGACCT | TATGGGACTT | TCCTACTTGG |
| 1 seq pTGFG36 | CAGTACATCT | ACGTATTAGT | CATCGCTATT | ACCATCGTGA | TGCGGTTTTG |
| 1 seq pTGFG36 | GCAGTACATC | ATGGGGCGTG | GATAGCGGTT | TGACTCACCG | GGATTTCCAA |
| 1 seq pTGFG36 | GTCTCCACCC | CATTGACGTC | ATGGGGAGTT | TGTTTTGGCA | CCAAAATCAA |
| 1 seq pTGFG36 | CCGGACTTTC | CAAAATGTGG | TAACAACCTC | GCCCCATGTA | CGCAAATGGG |
| 1 seq pTGFG36 | CGGTAGGCGT | GTACGGTGGG | AGGTCTATAT | AAGCAGAGCT | CTCTGGCTAA |
| 1 seq pTGFG36 | CTAGAGAACC | CACTGCTTAC | TGGCTTATCG | AAATTAATAC | GACTCACTAT |
| 1 seq pTGFG36 | AGGGAGACCC | AGCTTGCAT | GCCAATTCGG | CAAAGCTTAT | GCAGCGCGTG |
| 1 seq pTGFG36 | AACATGATCA | TGGCAGAATC | ACCAGGCCTC | ATCAACATCT | GCCTTTTAGG |
| 1 seq pTGFG36 | ATATCTACTC | AGTGCTGAAT | GTACAGTTTT | TCTTGATCAT | GAAAACGCCA |
| 1 seq pTGFG36 | ACAAAATTCT | CAATCGGCCA | AGAGGTATA | ATTCACGTAA | ATTGGAAGAG |
| 1 seq pTGFG36 | TTTGTTCAAG | GGAACCTTGA | GAGAGAATGT | ATGGAAGAAA | AGTGTAGTTT |
| 1 seq pTGFG36 | TGAAGAAGCA | CGAGAAGTTT | TTGAAAACAC | TGAAGAACA | ACTGAATTTT |

| | | | | | |
|--------------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| sequenz pTGFG36 13.12.1993 20:16 Uhr | | | | | |
| | 960 | 970 | 980 | 990 | 1000 |
| seq pTGFG36 | GGAAGCACTA | TGTTGATGGA | GATCAGTGTG | AGTCCCATCC | ATGTTTAAAT |
| | 1010 | 1020 | 1030 | 1040 | 1050 |
| seq pTGFG36 | GGCGGCAGTT | GCAAGGATGA | CATTAAATCC | TATGAATGTT | GCTGTCCCTT |
| | 1060 | 1070 | 1080 | 1090 | 1100 |
| seq pTGFG36 | TGGATTGAA | GGAAAGAACT | GTGAATTAGA | TGTAACATGT | AACATTAAGA |
| | 1110 | 1120 | 1130 | 1140 | 1150 |
| seq pTGFG36 | ATGGCAGATG | CGAGCAGTTT | TGTAAAATA | GTGCTGATAA | CAAGGTGGTT |
| | 1160 | 1170 | 1180 | 1190 | 1200 |
| seq pTGFG36 | TGCTCCTGTA | CTGAGGGATA | TGCACTTGCA | GAAACCAGA | AGTCCTGTGA |
| | 1210 | 1220 | 1230 | 1240 | 1250 |
| seq pTGFG36 | ACCAGCAGTG | CCATTTCAT | GTGGAAGAGT | TTCTGTTTCA | CAAACCTCTA |
| | 1260 | 1270 | 1280 | 1290 | 1300 |
| seq pTGFG36 | AGCTCACCCG | TGCTGAGACT | GTTTTCTCTG | ATGTGGACTA | TGTAAATTCT |
| | 1310 | 1320 | 1330 | 1340 | 1350 |
| seq pTGFG36 | ACTGAAGCTG | AAACCATETT | GGATAACATC | ACTCAAGCA | CCCAATCATT |
| | 1360 | 1370 | 1380 | 1390 | 1400 |
| seq pTGFG36 | TAATGACTTC | ACTCGGGTGT | TGGTGAGAGA | AGATGCCAAA | CCAGGTCAAT |
| | 1410 | 1420 | 1430 | 1440 | 1450 |
| seq pTGFG36 | TCCCTTGGCA | GGTTGTTTGT | AATGGTAAAG | TTGATGCATT | CTGTGGAGGC |
| | 1460 | 1470 | 1480 | 1490 | 1500 |
| seq pTGFG36 | TCTATCGTTA | ATGAAATMTG | GATTGTAAC | GCTGCCCACT | GTGTTGAAAC |
| | 1510 | 1520 | 1530 | 1540 | 1550 |
| seq pTGFG36 | TGGTGTTAAA | ATTACAGTTG | TGCAGGTGA | ACATAATATT | GAGGAGACAG |
| | 1560 | 1570 | 1580 | 1590 | 1600 |
| seq pTGFG36 | AACATACAGA | GCAAAAGCGA | PATGTGATT | GAATTATCC | TCACCACAAC |
| | 1610 | 1620 | 1630 | 1640 | 1650 |
| seq pTGFG36 | TACAATGCAG | CTATTATATA | GTACAACCAT | GACATTGCC | TTCTGGAACT |
| | 1660 | 1670 | 1680 | 1690 | 1700 |
| seq pTGFG36 | GGACGAACCC | TTAGTGCTAA | ACAGCTACGT | TACACCTATT | TGCATTGCTG |
| | 1710 | 1720 | 1730 | 1740 | 1750 |
| seq pTGFG36 | ACAAGGAATA | CACGAACATC | TTCTCAAAT | TTGGATCTGG | CTATGTAAGT |
| | 1760 | 1770 | 1780 | 1790 | 1800 |
| seq pTGFG36 | GGCTGGGGAA | GAGTCTTCCA | CAAAGGGAGA | TCAGCTTTAG | TCTTCAGTA |
| | 1810 | 1820 | 1830 | 1840 | 1850 |
| seq pTGFG36 | CCTTAGAGTT | CCACTTCTTG | ACCGAGCCAC | ATGTCTTCGA | TCTACAAAGT |
| | 1860 | 1870 | 1880 | 1890 | 1900 |
| seq pTGFG36 | TCACCATCTA | TAACAACATG | TTCTGTGCTG | GCTTCCATGA | AGGAGGTAGA |

| | | | | | |
|--------------------------------------|-------------|------------|------------|-------------|------------|
| sequenz pTGFG36 13.12.1998 20:16 Uhr | | | | | |
| | 1910 | 1920 | 1930 | 1940 | 1950 |
| seq pTGFG36 | GATTCATGTC | AAGGAGATAG | TGGGGGACCC | CATGTTACTG | AAGTGGAGG |
| | 1960 | 1970 | 1980 | 1990 | 2000 |
| seq pTGFG36 | GACCAGTTTC | TAACTGGAA | TTATTAGCTG | GGGTGAAGAG | TGTGCAATGA |
| | 2010 | 2020 | 2030 | 2040 | 2050 |
| seq pTGFG36 | AAGGCAATA | TGGAATATAT | ACCAAGGTAT | CCCGGTATGT | CAACTGGATT |
| | 2060 | 2070 | 2080 | 2090 | 2100 |
| seq pTGFG36 | AAGGAAAAA | CRAAGCTCAC | TTAATGGGAT | CGGTCCAGCG | GCCGCGACTC |
| | 2110 | 2120 | 2130 | 2140 | 2150 |
| seq pTGFG36 | TACTAGAGGA | TCTTTGTGAA | GGAACCTTAC | TTCTGTGCTG | TGACATAATT |
| | 2160 | 2170 | 2180 | 2190 | 2200 |
| seq pTGFG36 | GGACAAACTA | CCTACAGAGA | TTAAAGCTC | TAAAGGTAAT | ATAAAATTTT |
| | 2210 | 2220 | 2230 | 2240 | 2250 |
| seq pTGFG36 | TAAGTGATA | ATGTGTTAAA | CTACTGATTC | TAATTGTTTG | TGTATTTTAG |
| | 2260 | 2270 | 2280 | 2290 | 2300 |
| seq pTGFG36 | ATTCCAACCT | ATGGAAGTGA | TGAATGGGAG | CAGTGGTGGG | ATGCCTTTAA |
| | 2310 | 2320 | 2330 | 2340 | 2350 |
| seq pTGFG36 | TGAGGAARAC | CTGTTTGTCT | CAGAAGAANT | GCCATCTAGT | GATGATGAGG |
| | 2360 | 2370 | 2380 | 2390 | 2400 |
| seq pTGFG36 | CTACTGCTGA | CTCTCAACAT | TCTACTCCTC | CAAAAAGAA | GAGAAAGGTA |
| | 2410 | 2420 | 2430 | 2440 | 2450 |
| seq pTGFG36 | GAAGACCCCA | AGGACTTTCC | TTCAAGATTG | CTAAGTTTTT | TGAGTCATGC |
| | 2460 | 2470 | 2480 | 2490 | 2500 |
| seq pTGFG36 | TGTGTTTAGT | AATAGAACTC | TTGCTTGCTT | TGCTATTTAC | ACCACAAAGG |
| | 2510 | 2520 | 2530 | 2540 | 2550 |
| seq pTGFG36 | AAAAAGCTGC | ACTGCTATAC | AAGAAAATTA | TGGAARAATA | TTCTGTAACC |
| | 2560 | 2570 | 2580 | 2590 | 2600 |
| seq pTGFG36 | TTTATAAGTA | GGCATAACAG | TTATAATCAT | AACATACTGT | TTTTTCTTAC |
| | 2610 | 2620 | 2630 | 2640 | 2650 |
| seq pTGFG36 | TCCACACAGG | CATAGAGTGT | CTGCTATTAA | TAACTATGCT | CAAAAATGTG |
| | 2660 | 2670 | 2680 | 2690 | 2700 |
| seq pTGFG36 | GTACCTTTAG | CTTTTAAATT | TGTAAAGGGG | TTAATTAAGGA | ATATTTGATG |
| | 2710 | 2720 | 2730 | 2740 | 2750 |
| seq pTGFG36 | TATAGTGCCT | TGACTAGAGA | TCATAATCAG | CCATACCACA | TTGTAGAGG |
| | 2760 | 2770 | 2780 | 2790 | 2800 |
| seq pTGFG36 | TTTTACTTGC | TTTAAAAAAC | CTCCACACAC | TCCCCCTGAA | CCTGAACAT |
| | 2810 | 2820 | 2830 | 2840 | 2850 |
| seq pTGFG36 | AAAATGAANTG | CAATTGTTGT | TGTTAACTTG | TTTATTGCAG | CTTATAATGC |

| | | | | | |
|--------------------------------------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| sequenz pTGFG36 13.12.1993 20:16 Uhr | | | | | |
| | 2860 | 2870 | 2880 | 2890 | 2900 |
| seq pTGFG36 | TTACCAATAA | AGCAATAGCA | TCACAAATTT | CACAAATAAA | GCATTTTTTT |
| | 2910 | 2920 | 2930 | 2940 | 2950 |
| seq pTGFG36 | CACATGCATTC | TAGTTGTGGT | TGTCCAAAC | TCATCAATGT | ATCTTATCAT |
| | 2960 | 2970 | 2980 | 2990 | 3000 |
| seq pTGFG36 | GTCTGGATCC | CCGGGTACCC | TCTAGAGCGA | ATTAATTCAC | TGGCCGTCGT |
| | 3010 | 3020 | 3030 | 3040 | 3050 |
| seq pTGFG36 | TTTACAACGT | CGTACTGGG | AAAACCCTGG | CGTACCCAA | CTTAATCGCC |
| | 3060 | 3070 | 3080 | 3090 | 3100 |
| seq pTGFG36 | TTGCAGCACA | TCCCCCTTC | GCCAGCTGGC | GTAATAGCGA | AGAGGCCCCG |
| | 3110 | 3120 | 3130 | 3140 | 3150 |
| seq pTGFG36 | ACCGATCGCC | CTCCCAACA | GTGCGCAGC | CTGAATGGCG | AATGGCGCCT |
| | 3160 | 3170 | 3180 | 3190 | 3200 |
| seq pTGFG36 | GATGCGGTAT | TITCTCCTTA | CGCATCTGTG | CGGTATTTC | CACCGCATAT |
| | 3210 | 3220 | 3230 | 3240 | 3250 |
| seq pTGFG36 | GGTGCACTCT | CAGTACAATC | TGCTCTGATG | CCGCATAGTT | AAGCCAGCCC |
| | 3260 | 3270 | 3280 | 3290 | 3300 |
| seq pTGFG36 | CGACACCCGC | CAACACCCGC | TGACGCGCCC | TGACGCGCTT | GTCTGCTCCC |
| | 3310 | 3320 | 3330 | 3340 | 3350 |
| seq pTGFG36 | GGCATCCGCT | TACAGACAAG | CTGTGACCGT | CTCCGGGAGC | TGCATGTGTC |
| | 3360 | 3370 | 3380 | 3390 | 3400 |
| seq pTGFG36 | AGAGGTTTTT | ACCGTCATCA | CCGAAACGCG | CGAGACGAAA | GCGGGGGTAC |
| | 3410 | 3420 | 3430 | 3440 | 3450 |
| seq pTGFG36 | CAGCTTCGTA | GCTAGAACAT | CATGTTCTGG | GATATCAGCT | TCGTAGCTAG |
| | 3460 | 3470 | 3480 | 3490 | 3500 |
| seq pTGFG36 | AACATCATGT | TCTGGTACCC | CCCTCGTGAT | ACGCCTATTT | TTATAGGTTA |
| | 3510 | 3520 | 3530 | 3540 | 3550 |
| seq pTGFG36 | ATGTCATGAT | AATAATGGTT | TCTTAGACGT | CAGGTGSCAC | TTTCGGGGA |
| | 3560 | 3570 | 3580 | 3590 | 3600 |
| seq pTGFG36 | AATGTGCGCG | GAACCCCTAT | TGTTTTATTT | TTCTAATAC | ATTCAAATAT |
| | 3610 | 3620 | 3630 | 3640 | 3650 |
| seq pTGFG36 | GTATCCGCTC | ATGAGACAAT | AACCCTGATA | AATGCTTCAA | TAATATTGAA |
| | 3660 | 3670 | 3680 | 3690 | 3700 |
| seq pTGFG36 | AAGAGGAAGAG | TATGAGTATT | CAACATTTCC | GTGTCCGCCT | TATTCCTTTT |
| | 3710 | 3720 | 3730 | 3740 | 3750 |
| seq pTGFG36 | TTTGCGGCAT | TTGCCTTCC | TGTTTTGCT | CACCCAGAAA | CGCTGGTGAA |
| | 3760 | 3770 | 3780 | 3790 | 3800 |
| seq pTGFG36 | AGTAAAGAT | GCTGAAGATC | AGTTGGGTGC | ACGAGTGGGT | TACATCGAAC |

sequenz pTGFG36 13.12.1998 20:16 Uhr

| | | | | | |
|-------------|------------|------------|-------------|------------|------------|
| | 3810 | 3820 | 3830 | 3840 | 3850 |
| seq pTGFG36 | TGGATCTCAA | CAGCGGTAAG | ATCCTTGAGA | GTTTTCGCCC | CGAAGAACGT |
| | 3860 | 3870 | 3880 | 3890 | 3900 |
| seq pTGFG36 | TTTCCAATGA | TGAGCACTTT | TAAAGTTCTG | CTATGTGGCG | CGGTATTATC |
| | 3910 | 3920 | 3930 | 3940 | 3950 |
| seq pTGFG36 | CCGTATTGAC | GCCGGGCAAG | AGCAACTCGG | TCGCCGCATA | CACTATTCTC |
| | 3960 | 3970 | 3980 | 3990 | 4000 |
| seq pTGFG36 | AGAATGACTT | GGTTGAGTAC | TCACCACTCA | CAGAAAAGCA | TCTTACGGAT |
| | 4010 | 4020 | 4030 | 4040 | 4050 |
| seq pTGFG36 | GGCATGACAG | TAAGAGAATT | ATGCAGTGCT | GCCATPACCA | TGAGTGATAA |
| | 4060 | 4070 | 4080 | 4090 | 4100 |
| seq pTGFG36 | CACTGCGGCC | ACTTACTTTC | TGACAACGAT | CGGAGGACCG | AAGGAGCTAA |
| | 4110 | 4120 | 4130 | 4140 | 4150 |
| seq pTGFG36 | CCGCTTTTTC | GCACAACATG | GGGGATCATG | TAACTCGCCT | TGATCGTTGG |
| | 4160 | 4170 | 4180 | 4190 | 4200 |
| seq pTGFG36 | GAACCGGAGC | TGAATGAAGC | CATACCAAAC | GACGAGCGTG | ACACCACGAT |
| | 4210 | 4220 | 4230 | 4240 | 4250 |
| seq pTGFG36 | GCCTGTAGCA | ATGGCAACAA | CGTTGCGCAA | ACTATTAAC | GGCGAACTAC |
| | 4260 | 4270 | 4280 | 4290 | 4300 |
| seq pTGFG36 | TTACTCTAGC | TCCCGGCAA | CAATTAATAG | ACTGGATGGA | GGCGGATAAA |
| | 4310 | 4320 | 4330 | 4340 | 4350 |
| seq pTGFG36 | GTTGCAGGAC | CACTTCTGCG | CTCGGCCCTT | CCGGCTGGCT | GGTTTATTGC |
| | 4360 | 4370 | 4380 | 4390 | 4400 |
| seq pTGFG36 | TGATAAATCT | GGAGCCGGTG | AGCGTGGGTC | TCGCGGTATC | ATTGCAGCAC |
| | 4410 | 4420 | 4430 | 4440 | 4450 |
| seq pTGFG36 | TGGGCCCAGA | TGGTAAGCCC | TCCCGTATCG | TAGTTATCTA | CACGACGGGG |
| | 4460 | 4470 | 4480 | 4490 | 4500 |
| seq pTGFG36 | AGTCAGGCAA | CTATGGATGA | ACGAAATAGA | CAGATCGCTG | AGATAGGTGC |
| | 4510 | 4520 | 4530 | 4540 | 4550 |
| seq pTGFG36 | CTCACTGATT | AAGCATTGGT | AACGTGTCAGA | CCAGTTTAC | TCATATATAC |
| | 4560 | 4570 | 4580 | 4590 | 4600 |
| seq pTGFG36 | TTTAGATTGA | TTTAAACTT | CATTTTAAAT | TTAAAGGAT | CTAGGTGAAG |
| | 4610 | 4620 | 4630 | 4640 | 4650 |
| seq pTGFG36 | ATCCTTTTTC | ATAATCTCAT | GACCAAAATC | CCTTACGCTG | AGTTTTCGTT |
| | 4660 | 4670 | 4680 | 4690 | 4700 |
| seq pTGFG36 | CCACTGAGCG | TCAGACCCCG | TAGAAAAGAT | CAAGGATCT | TCTTGAGATC |
| | 4710 | 4720 | 4730 | 4740 | 4750 |
| seq pTGFG36 | CTTTTTTCT | GCGCGTAATC | TGCTGCTTGC | AAACAAAAAA | ACCACCGCTA |

| | | | | | |
|-----------------|------------|-------------|------------|------------|------------|
| sequenz pTGFG36 | 13.12.1998 | 20:16 Uhr | | | |
| | 4760 | 4770 | 4780 | 4790 | 4800 |
| seq pTGFG36 | CCAGCGGTGG | TTGTGTTGCC | GGATCAAGAG | CTACCAACTC | TTTTCCGAA |
| | 4810 | 4820 | 4830 | 4840 | 4850 |
| seq pTGFG36 | GGTAACTGGC | TTCAGCAGAG | CGCAGATACC | AAATACTGTT | CTTCTAGTGT |
| | 4860 | 4870 | 4880 | 4890 | 4900 |
| seq pTGFG36 | AGCCGTAGTT | AGGCCACCAC | TCAAGAACT | CTGTAGCACC | GCCTACATAC |
| | 4910 | 4920 | 4930 | 4940 | 4950 |
| seq pTGFG36 | CTCGCTCTGC | TAATCCTGTT | ACCACTGGCT | GCTGCCAGTG | GCGATAAGTC |
| | 4960 | 4970 | 4980 | 4990 | 5000 |
| seq pTGFG36 | GTGTCTTACC | CGGTGGAAT | CAAGACGATA | GTTACCGGAT | AAGGCGCAGC |
| | 5010 | 5020 | 5030 | 5040 | 5050 |
| seq pTGFG36 | GGTCGGGCTG | AACGGGGGGT | TCGTGCACAC | AGCCCAGCTT | GGAGCGAACC |
| | 5060 | 5070 | 5080 | 5090 | 5100 |
| seq pTGFG36 | ACCTACACCG | AACTGAGATA | CCTACAGCGT | GAGCTATGAG | AAAGCGCCAC |
| | 5110 | 5120 | 5130 | 5140 | 5150 |
| seq pTGFG36 | GCTTCCCGAA | GGGAGAAAGG | CGGACAGGTA | TCCCGTAAGC | GGCAGGGTGC |
| | 5160 | 5170 | 5180 | 5190 | 5200 |
| seq pTGFG36 | GAACAGGAGA | GCGCACGAGG | GAGCTTCCAG | GGGAAACCC | CTGGTATCTT |
| | 5210 | 5220 | 5230 | 5240 | 5250 |
| seq pTGFG36 | TATAGTCCTG | TCGGGTTTCG | CCACCTCTGA | CTTGAGCGTC | GATTTTGTG |
| | 5260 | 5270 | 5280 | 5290 | 5300 |
| seq pTGFG36 | ATGCTCGTCA | GGGGGGCGGA | GCCTATGGAA | AAACGCCAGC | AACGCCGCCT |
| | 5310 | 5320 | 5330 | 5340 | 5350 |
| seq pTGFG36 | TTTTACGGTT | CCTGGCCTTT | TGCTGGCCTT | TGCTCACAT | GTTCTTTCTT |
| | 5360 | 5370 | 5380 | 5390 | 5400 |
| seq pTGFG36 | GCGTTATCCC | CTGATTCTGT | GGATAACCGT | ATTACCGCCT | TTGAGTGAGC |
| | 5410 | 5420 | 5430 | 5440 | 5450 |
| seq pTGFG36 | TGATACCGCT | CGCCGCAGCC | GAACGACCGA | GCGCAGCGAG | TCAGTGAGCG |
| | 5460 | 5470 | 5480 | 5490 | 5500 |
| seq pTGFG36 | AGGAAGCGGA | AGAGCGCCCA | ATACGCAAAC | CGCCTCTCCC | CGCGCGTTGG |
| | 5510 | 5520 | 5530 | 5540 | 5550 |
| seq pTGFG36 | CCGATTCAAT | AATGCAGCTG | CCACGACAGG | TTTCCGACT | GGAAAGCGGG |
| | 5560 | 5570 | 5580 | 5590 | 5600 |
| seq pTGFG36 | CAGTGAGCGC | ARCAGCAATTA | ATGTGAGTTA | GCTCACTCAT | TAGGCACCCC |
| | 5610 | 5620 | 5630 | 5640 | 5650 |
| seq pTGFG36 | AGGCTTTACA | CTTATGCTT | CCGGCTCGTA | TGTTGTGTGG | AATTGTGAGC |
| | 5660 | 5670 | 5680 | 5690 | 5700 |
| seq pTGFG36 | GGATAACAAT | TTACACAGG | AAACAGCTAT | GACCATGATT | ACGCCAAGCT |

| | | | | | | | | |
|-----------------|------------|------------|------------|------------|------------|--|--|--|
| sequenz DTGFG36 | 13.12.1998 | 20:16 Uhr | | | | | | |
| | 5710 | 5720 | 5730 | 5740 | 5750 | | | |
| seq DTGFG36 | CTCTAGAGCT | CTAGAGCTCT | AGAGCTCTAG | AGAGCTTGCA | TGCCTGCAGG | | | |
| | 5760 | 5770 | 5780 | 5790 | 5800 | | | |
| seq DTGFG36 | TCG | | | | | | | |

Abbildung 12

| | |
|---------------|---|
| 1 seq PTGFG67 | CCCGTTGACA TTGTTATTG ACTACTTATT ATTGTTATC AATTACGGCG |
| 1 seq PTGFG67 | TCATTAGTTC ATAGCCCATTA TATGGAGTTC CGCGTTACAT AACTTACGGT |
| 1 seq PTGFG67 | AAATGGCCCC CCTGGCTGAC CGCCCAACGA CCCCCGCCA TTGACGTCAA |
| 1 seq PTGFG67 | TATAGACGTA TGTTCCCATA GTAACGCCAA TAGGACTTT CCATTGACGT |
| 1 seq PTGFG67 | CAATGGGTGG AGTATTTAGG GTAAACTGCC CACTGGCAG TACATCAAGT |
| 1 seq PTGFG67 | GTATCATATG CCAAGTACGC CCCCTATTGA CTTCAATGAC GGTAAATGCC |
| 1 seq PTGFG67 | CCCCCTGGCA TTATGCCCAG TACATGACCT TATGGGACTT TCCTACTTGG |
| 1 seq PTGFG67 | CAGTACATCT ACGTATTAGT CATCGCTATT ACCATCGTGA TCGGTTTTTG |
| 1 seq PTGFG67 | GCAGTACATC AATGGGCGTG GATAGCGGTT TGAATCAGG CGATTTCCTA |
| 1 seq PTGFG67 | GTCTCCACCC CATTGACGTC AATGGGAGTT TGTTTTGCCA CCAATATCAA |
| 1 seq PTGFG67 | CGCGACTTTC CAATATGTG TAACTACTCC GCGCCATTGA CGCAATGGG |
| 1 seq PTGFG67 | CGGTAGGCGT GTACGGTGGG AGGTCTATAT AAGCGAGCT CTCTGGCTAA |
| 1 seq PTGFG67 | CTAGGAACCC CACTGCTTAC TGGCTTATCG AATTAATAC GACTCACTAT |
| 1 seq PTGFG67 | AGGGAGACCC AAGCTTGACC TCGAGCAAGC GGCCGCGACT CTACTAGAGG |
| 1 seq PTGFG67 | ATCTTTGTGA AGGACCTTA CTTCTGTGGT GTGTCATAAT TGGACAACT |
| 1 seq PTGFG67 | ACCTTCAGAG ATTAAAGCT CTAAGGTRAA TATTAATTT TTAAGTGTAT |
| 1 seq PTGFG67 | AATGTGTTAA ACTACTGATT CTATTGTTT GTGTATTTA GATTCCAACC |
| 1 seq PTGFG67 | TATGGAAGTG ATGATGGGA GCACTGGTGG AATGCCTTTA ATGAGGAAA |
| 1 seq PTGFG67 | CCTGTITTGC TCAGAGAAA TGCCATCTAG TGATGATGAG CTTACTGCTG |

| | | | | | |
|-----------------|--|-------|------|------|------|
| sequenz pTGFG67 | 13.12.19 | 21:02 | | | |
| | 950 | 970 | 980 | 990 | 1000 |
| seq pTGFG67 | ACTCACAACA TTCTACTCCT CCAAAAAAGA AGCAGAGCT AGAAGACCCC | | | | |
| | 1010 | 1020 | 1030 | 1040 | 1050 |
| seq pTGFG67 | AAGGACTTTC CTTCAGAATT GCTAAGTTTT TTGAGTCATG CTGTGTTTAC | | | | |
| | 1060 | 1070 | 1080 | 1090 | 1100 |
| seq pTGFG67 | TAATAGAACT CTTCCTTGCT TTGCTATTTA CACCACAAG GAAAAAGCTG | | | | |
| | 1110 | 1120 | 1130 | 1140 | 1150 |
| seq pTGFG67 | CACTGCTATA CAAGAAAATT ATGGAATAAT ATTCTGTAAC CTTTATAAGT | | | | |
| | 1160 | 1170 | 1180 | 1190 | 1200 |
| seq pTGFG67 | AGGCATAACA GTTATAATCA TAACATACTG TTTTTCCTTA CTCCACACAG | | | | |
| | 1210 | 1220 | 1230 | 1240 | 1250 |
| seq pTGFG67 | GCATAGAGTG TCTGCTATTA ATAACATGCT TCAPAAATTG TGTACCTTTA | | | | |
| | 1260 | 1270 | 1280 | 1290 | 1300 |
| seq pTGFG67 | GCTTTTAAAT TTGTAAAGGG GTTAATAAGG AATATTGAT GTATAGTCCC | | | | |
| | 1310 | 1320 | 1330 | 1340 | 1350 |
| seq pTGFG67 | TTGACTAGAG ATCATAATCA GCCATACCAC ATTTGTAGAG GTTTTACTTG | | | | |
| | 1360 | 1370 | 1380 | 1390 | 1400 |
| seq pTGFG67 | CTTTAAAAA CCTCCACAC CTCCCCCTGA ACCTCAACA TAAATGAAT | | | | |
| | 1410 | 1420 | 1430 | 1440 | 1450 |
| seq pTGFG67 | GCAATGTGTG TTGTTAATT GTTTATGCA GCTTATATG GTTACAATA | | | | |
| | 1460 | 1470 | 1480 | 1490 | 1500 |
| seq pTGFG67 | AAGCAATAGC ATCACAATTT TCACAAATAA AGCATTTTTT TCACTGCATT | | | | |
| | 1510 | 1520 | 1530 | 1540 | 1550 |
| seq pTGFG67 | CTAGTGTGG TTGTCCAAA CTCATCAATG TATCTTATCA TGTCTGGATC | | | | |
| | 1560 | 1570 | 1580 | 1590 | 1600 |
| seq pTGFG67 | CCCCGCTACC CTCTAGAGCG AATTAATTCA CTGGCCGTGG TTTTACAACG | | | | |
| | 1610 | 1620 | 1630 | 1640 | 1650 |
| seq pTGFG67 | TCGTGACTGG GAAACCCTG GCGTTACCCA ACTTAATCGC CTTCAGCAC | | | | |
| | 1660 | 1670 | 1680 | 1690 | 1700 |
| seq pTGFG67 | ATCCCCCTTT CGCCAGCTGG CGTAATAGCG AAGAGCCCCG CACCGATCGC | | | | |
| | 1710 | 1720 | 1730 | 1740 | 1750 |
| seq pTGFG67 | CCTTCCCAAC AGTTGCGCAG CCTGAATGGC GAATGGCGCC TGATGCGGTA | | | | |
| | 1760 | 1770 | 1780 | 1790 | 1800 |
| seq pTGFG67 | TTTTCTCCTT ACGCATCTGT GCGGTATTTC ACACCGCATA TGGTGCACTC | | | | |
| | 1810 | 1820 | 1830 | 1840 | 1850 |
| seq pTGFG67 | TCAGTACAAT CTGCTCTGAT GCGGCATAGT TAAGCCAGCC CCGACACCCG | | | | |
| | 1860 | 1870 | 1880 | 1890 | 1900 |
| seq pTGFG67 | CCAACACCCG CTGACGCGCC CTGACGGGCT TGTCTGCTCC CGGCATCCGC | | | | |

| | | | | | |
|-------------------------------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| Sequenz pTGFG67 13.12.1 ; 21:02 Uhr | | | | | |
| | 1910 | 1920 | 1930 | 1940 | 1950 |
| 1 seq pTGFG67 | TTACAGACAA | GCTGTGACCG | TCTCCGGGAG | CTCCATGTGT | CAGAGCTTTT |
| | 1960 | 1970 | 1980 | 1990 | 2000 |
| 1 seq pTGFG67 | CACCGTCATC | ACCGAARCCG | GCGAGACGAA | AGGCCGGGTA | CCAGCTTCGT |
| | 2010 | 2020 | 2030 | 2040 | 2050 |
| 1 seq pTGFG67 | AGCTAGAACA | TCATGTTCTG | GGATATCAGC | TTGGTAGCTA | GAACATCATC |
| | 2060 | 2070 | 2080 | 2090 | 2100 |
| 1 seq pTGFG67 | TTCTGGTACC | CCCCTCGTGA | TACGCCTATT | TTTATGGGTT | AATGTCATGA |
| | 2110 | 2120 | 2130 | 2140 | 2150 |
| 1 seq pTGFG67 | TAATAATGCT | TTCTTAGACG | TCAGGTGGCA | CTTTTCGGGG | AAATGTGCGC |
| | 2160 | 2170 | 2180 | 2190 | 2200 |
| 1 seq pTGFG67 | GGAACCCCTA | TTTGTITATT | TTTCTAAATA | CATTCAAATA | TGTATCCGCT |
| | 2210 | 2220 | 2230 | 2240 | 2250 |
| 1 seq pTGFG67 | CATGAGACAA | TAACCCCTGAT | AAATGCTTCA | ATPATATTTGA | AAAAGGAAGA |
| | 2260 | 2270 | 2280 | 2290 | 2300 |
| 1 seq pTGFG67 | GTATGAGTAT | TCAACATTTT | CGTGTGCGCC | TTATTCCTTT | TTTTCGGCA |
| | 2310 | 2320 | 2330 | 2340 | 2350 |
| 1 seq pTGFG67 | TTTTCCTTTC | CTGTTTTTGC | TCACCCAGAA | ACGCTGGTGA | AAGTAAAAGA |
| | 2360 | 2370 | 2380 | 2390 | 2400 |
| 1 seq pTGFG67 | TGCTGAAGAT | CAGTTGGGTG | CACGAGTGGG | TTACATCGAA | CTGGATCTCA |
| | 2410 | 2420 | 2430 | 2440 | 2450 |
| 1 seq pTGFG67 | ACAGCGGTAA | GATCCTTGAG | AGTTTTCGCC | CCGAGAACG | TTTTCCAATG |
| | 2460 | 2470 | 2480 | 2490 | 2500 |
| 1 seq pTGFG67 | ATGAGCACTT | TTAAAGTTCT | GCTATGTGGC | GCGGTATTAT | CCCGTATTGA |
| | 2510 | 2520 | 2530 | 2540 | 2550 |
| 1 seq pTGFG67 | CGCCGGGCAA | GAGCAACTCG | GTCGCCGCAT | ACACTATTCT | CAGAATGACT |
| | 2560 | 2570 | 2580 | 2590 | 2600 |
| 1 seq pTGFG67 | TGGTTGAGTA | CTCACCAGTC | ACAGAAAAGC | ATCTTACGGA | TGGCATGACA |
| | 2610 | 2620 | 2630 | 2640 | 2650 |
| 1 seq pTGFG67 | GTAAGAGAAT | TATGCAGTGC | TGCCATAACC | ATGAGTGATA | ACACTGCGGC |
| | 2660 | 2670 | 2680 | 2690 | 2700 |
| 1 seq pTGFG67 | CAACTTACTT | CTGACAACGA | TCGGAGGACC | GAAGGACCTA | ACCGCTTTTT |
| | 2710 | 2720 | 2730 | 2740 | 2750 |
| 1 seq pTGFG67 | TGCACAACAT | GGGGGATCAT | GTAATCTGCC | TTGATCGTTG | GGAACCGGAG |
| | 2760 | 2770 | 2780 | 2790 | 2800 |
| 1 seq pTGFG67 | CTGAATGAAG | CCATACCAA | CGACGAGCGT | GACACCACGA | TGCCTGTAGC |
| | 2810 | 2820 | 2830 | 2840 | 2850 |

| | | | | | |
|-----------------|------------|------------|-------------|------------|------------|
| sequenz pTGFG67 | 13.12.199 | 21:02 Uhr | | | |
| | 2860 | 2870 | 2880 | 2890 | 2900 |
| seq pTGFG67 | CTTCCCGGCA | ACAATTAATA | GACTCGATGG | AGGCGGATAA | AGTTGCRGGA |
| | 2910 | 2920 | 2930 | 2940 | 2950 |
| seq pTGFG67 | CCACTTCTGC | GCTCGGCCCT | TCCGGCTGGC | TGGTTTATTG | CTGATAAATC |
| | 2960 | 2970 | 2980 | 2990 | 3000 |
| seq pTGFG67 | TGGAGCCCGT | GAGCGTGGGT | CTCGCGGTAT | CATTCCAGCA | CTGGGGCCAG |
| | 3010 | 3020 | 3030 | 3040 | 3050 |
| seq pTGFG67 | ATGGTAAGCC | CTCCCGTATC | GTA GTTATCT | ACACGACGGG | GAGTCAGGCA |
| | 3060 | 3070 | 3080 | 3090 | 3100 |
| seq pTGFG67 | ACTATGGATG | AACGAAATAG | ACAGATCGCT | GAGATAGGTG | CCTCACTGAT |
| | 3110 | 3120 | 3130 | 3140 | 3150 |
| seq pTGFG67 | TAAGCATTTG | TAACTGTCAG | ACCAAGTTTA | CTCATATATA | CTTTAGATTG |
| | 3160 | 3170 | 3180 | 3190 | 3200 |
| seq pTGFG67 | ATTTAARACT | TCATTTTAA | TTTAAAAGGA | TCTAGGTGAA | GATCCTTTTT |
| | 3210 | 3220 | 3230 | 3240 | 3250 |
| seq pTGFG67 | GATAATCTCA | TGACCAAAAT | CCCTTAACGT | GAGTTTTCGT | TCCACTGAGC |
| | 3260 | 3270 | 3280 | 3290 | 3300 |
| seq pTGFG67 | GTCAGACCCC | GTAGAAAAGA | TCAAAGGATC | TTCTTGAGAT | CCTTTTTTTC |
| | 3310 | 3320 | 3330 | 3340 | 3350 |
| seq pTGFG67 | TGCGCGTAAT | CTGCTGCTTG | CAAACAAAAA | AACCACCGCT | ACCAGCGGTG |
| | 3360 | 3370 | 3380 | 3390 | 3400 |
| seq pTGFG67 | GTTTGTTTGC | CGGATCAAGA | GCTACCAACT | CTTTTCCGA | AGGTAACTGG |
| | 3410 | 3420 | 3430 | 3440 | 3450 |
| seq pTGFG67 | CTTCAGCAGA | GCGCAGATAC | CAAATACTGT | TCTTCTAGTG | TAGCCGTAGT |
| | 3460 | 3470 | 3480 | 3490 | 3500 |
| seq pTGFG67 | TAGGCCACCA | CTCAAGAAC | TCTGTAGCAC | CGCCTAATA | CCTCGCTCTG |
| | 3510 | 3520 | 3530 | 3540 | 3550 |
| seq pTGFG67 | CTAATCCTGT | TACCAGTGGC | TGCTGCCAGT | GGCGATAGT | CGTGTCTTAC |
| | 3560 | 3570 | 3580 | 3590 | 3600 |
| seq pTGFG67 | CGGGTTGGAC | TCAAGACGAT | AGTTACCGGA | TAAGGCTCAG | CGGTCCGGCT |
| | 3610 | 3620 | 3630 | 3640 | 3650 |
| seq pTGFG67 | GAACGGGGGG | TTCGTGCACA | CAGCCCAGCT | TGGAGCTAAC | GACCTACACC |
| | 3660 | 3670 | 3680 | 3690 | 3700 |
| seq pTGFG67 | GAACTGAGAT | ACCTACAGCG | TGAGCTATGA | GAAAGCCCA | CGCTTCCCGA |
| | 3710 | 3720 | 3730 | 3740 | 3750 |
| seq pTGFG67 | AGGGAGAAAG | GCGGACAGGT | ATCCGGTAAG | CGGCACCGTC | GGAACAGGAG |
| | 3760 | 3770 | 3780 | 3790 | 3800 |
| seq pTGFG67 | AGCGCACGAG | GGAGCTTCCA | GGGGGAAACG | CCTGCTATCT | TTATAGTCCT |

Sequenz pTGFG67 13.12.19. 21:02 Uhr

| | | | | | |
|-------------|------------|------------|------------|------------|-------------|
| | 3810 | 3820 | 3830 | 3840 | 3850 |
| seq pTGFG67 | GTCCGGTTTC | GCCACCTCTG | ACTTGAGCGT | CGATTTTGT | GATGCTCGTC |
| | 3860 | 3870 | 3880 | 3890 | 3900 |
| seq pTGFG67 | AGGGGGCGCG | AGCCTATCGA | AAAACGCCAG | CAACGCGGCC | TTTTTACGGT |
| | 3910 | 3920 | 3930 | 3940 | 3950 |
| seq pTGFG67 | TCCTGGCCTT | TTGCTGGCCT | TTGCTCACA | TGTTCTTTCC | TGCGTTATCC |
| | 3960 | 3970 | 3980 | 3990 | 4000 |
| seq pTGFG67 | CCTGATTCTG | TGGATAACCG | TATTACCGCC | TTGAGTGAG | CTGATACCGC |
| | 4010 | 4020 | 4030 | 4040 | 4050 |
| seq pTGFG67 | TCGCCGCAGC | CGAACGACCG | AGCGCAGCGA | GTCAGTGAGC | GAGGAAGCGG |
| | 4060 | 4070 | 4080 | 4090 | 4100 |
| seq pTGFG67 | AAGAGCGCCC | AATACGCAAA | CCGCCTCTCC | CCGCGCGTTG | GCCGATTTCAT |
| | 4110 | 4120 | 4130 | 4140 | 4150 |
| seq pTGFG67 | TAATGCAGCT | GGCAGGACAG | GTTTCCCGAC | TGAAAGCGG | GCAGTGAGCG |
| | 4160 | 4170 | 4180 | 4190 | 4200 |
| seq pTGFG67 | CAACGCAATT | AATGTGAGTT | AGCTCACTCA | TTAGGCACCC | CAGGCTTTAC |
| | 4210 | 4220 | 4230 | 4240 | 4250 |
| seq pTGFG67 | ACTTTATGCT | TCCGGCTCGT | ATGTTGTGTG | GAATTGTGAG | CGGATAACAA |
| | 4260 | 4270 | 4280 | 4290 | 4300 |
| seq pTGFG67 | TTTCACACAG | GAAACAGCTA | TGACCATGAT | TACGCCAAGC | TCTCTAGAGC |
| | 4310 | 4320 | 4330 | 4340 | 4350 |
| seq pTGFG67 | TCTAGAGCTC | TAGAGCTCTA | GAGAGCTTGC | ATGCCTGCAG | GTCC |

Abbildung 48



Abbildung 48a



Abbildung 48b



Abbildung 48c

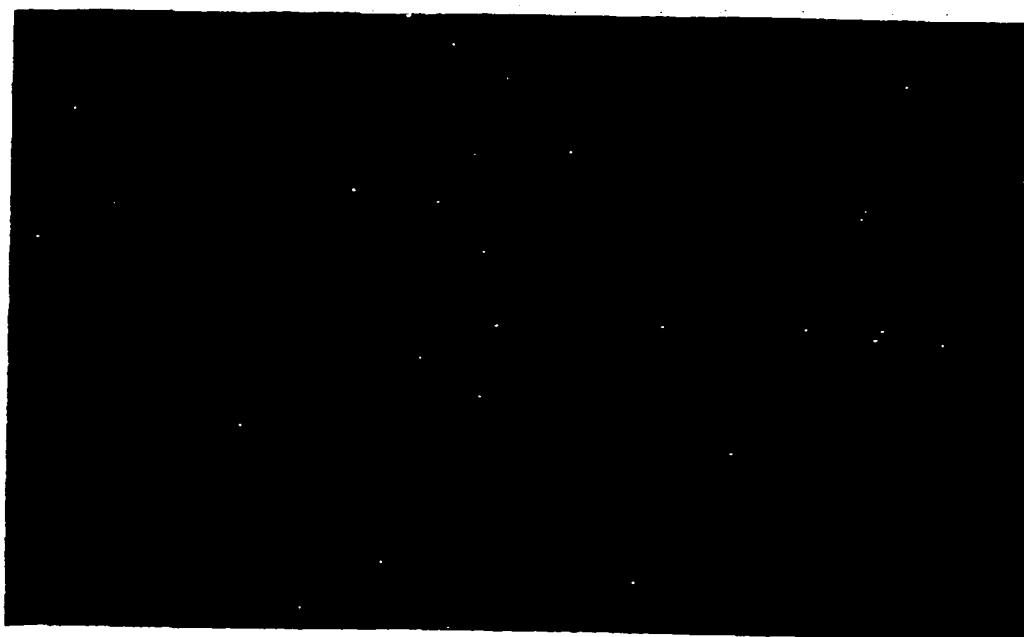


Abbildung 48d

Korrespondierende licht- (a und c) und fluroeszenzmikroskopische (b und d) Aufnahmen von HeLa-Zellen, die mit pTGFG5 (a und b) bzw. pTGFG20 (c und d) transfiziert wurden.